

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Análisis de Variabilidad Fenotípica y Diversidad Genética de poblaciones
sinantrópicas y silvestres de *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León) en dos
provincias endémicas para la Enfermedad de Chagas en Ecuador”**

Disertación previa a la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas

ANITA G. VILLACÍS SALAZAR

Quito, 2011

Yo, Dr. Mario J. Grijalva Cobo, certifico que la disertación de Doctorado en Ciencias Biológicas de la candidata Anita Gabriela Villacís Salazar ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Quito, 26 de octubre de 2011

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mario J. Grijalva Cobo', written in a cursive style.

Dr. Mario J. Grijalva Cobo

DIRECTOR DE LA DISERTACIÓN

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue posible gracias al apoyo de muchas personas e instituciones. Primero, quiero agradecer a mis padres Gladys y Juan, ya que sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de esta meta, por inculcarme virtudes como la perseverancia y la dedicación en el trabajo. A mis hermanos Juan Esteban y Carolina, Gabriel y Felipe por estar conmigo, como también a mis sobrinos Juan José y Joaquín, dos angelitos que iluminan mi vida.

Un agradecimiento profundo a mi esposo, César Yumiseva, por sus consejos, amor, comprensión, paciencia y aliento en todos los momentos. Como también a mis suegros Fernanda y César.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Mario Grijalva, director de tesis, por su apoyo incondicional, y por enseñarme la importancia y el verdadero sentido de la investigación, buscando como meta fundamental ayudar a los demás.

Gracias a la Dra. Laura Arcos-Terán decana de la Facultad de Ciencias Exactas, por el apoyo institucional, que ha sido fundamental en este proceso y a Olivier Dangles por sus consejos y apoyo científico. Un agradecimiento especial al Dr. Romel Montúfar por sus recomendaciones. A los doctores William Romoser, Ed Rowland, Calvin James, Jaime Costales, Sarah Wyatt, Marco Neira, S.J. Manuel Espinoza e Ing. Julio Sánchez por su disponibilidad de tiempo para impartir sus clases de una manera desinteresada.

Mil gracias a mi guía y co-directora Dra. Silvia Catalá, a quién admiro mucho por su trabajo, carisma, entusiasmo y dedicación y por transmitirme los conocimientos en el área científica sobre los vectores de la enfermedad de Chagas. A mis queridas amigas, Dra. Paula Marcet y Mst. Ana Troya que me brindaron su ayuda, sus consejos y enseñanzas en

el área molecular. Gracias a ustedes, que me han ayudado a cumplir uno de mis más grandes sueños.

A mi querida Familia CRILAR: Silvana Cheri Hoffman, María Laura Hernández, Luciana Abrahan, Ivana Amelotti, David Gorla, gracias, muchas gracias por acogerme en ese hermoso lugar. A mis queridos amigos Luis Rodríguez, Sofía Gordón y Miguel Pinto.

A mis compañeros y amigos que hacemos el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIEI) como nuestro hogar: Rosita Chiriboga, Sofía Ocaña, Gabriela Cueva, Esteban Baus, Carolina Crespo, Alejandra Zurita, Pedro Pineda, Paúl Briones, quienes supieron darme fuerzas para continuar adelante en la realización de este trabajo y por compartir conmigo su conocimiento.

Gracias al apoyo técnico, que hizo posible la realización de esta investigación: María Victoria Suárez, Sofía Muñoz, David Terán, María Fernanda Latorre, Andrea Zurita, Marco Orozco, Josselyn García del CIEI; a la Dra. Ellen Dotson, Gena Lawrence y Dr. Mauricio Lascano del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) por todo su tiempo y colaboración.

A todos los estudiantes de la Universidad de Ohio que colaboraron año a año en la recolección de información; un cariñoso agradecimiento al personal de campo del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM): Freddy Véliz, Edy Intriago, Yovany Sánchez, Wilmer Rivas, Wilter Rivas, Néstor Solórzano, Francisco Párraga, Yinmy Vélez, Arístides Ávila de Manabí; Giovanni Cumbicus, Hugo Jimenez, Victor Quizhpe, Santiago Montaña, Fausto Azuero, Angel Gualán de Loja; Jairo Mera y Javier Vélez de Santo Domingo de los Tsáchilas a quienes agradezco de corazón por tan significativo aporte al presente trabajo.

Un fraternal e inmenso agradecimiento a toda las personas de las comunidades de Loja y Manabí, por su entrega, entusiasmo, hospitalidad que me enseñaron el verdadero significado de la vida, que la riqueza de las personas no se mide por la cantidad de cosas materiales que se tiene, sino por la sencillez y humildad con que se vive a diario. Gracias por abrirme sus puertas y corazones!!!

Finalmente, este proyecto se realizó gracias al financiamiento y apoyo de las siguientes Instituciones: Organización Mundial de la Salud (OMS), Programa especial para la investigación y entrenamiento en Enfermedades Tropicales (UNICEF/UNDP/World Bank/WHO/TDR) por la beca concedida para la realización de los estudios de doctorado (ID: A60148); al Instituto Nacional de Salud (DMID/IAND/NIH), EE.UU, al Instituto de Enfermedades Tropicales de Ohio, EE.UU; al proyecto Chagas Epinet de la Unión Europea, a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE); Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica (CRILAR), Anillaco-Rioja-Argentina; Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta-Georgia-EE.UU; Biotecnología para Latinoamérica y el Caribe (UNU-BIOLAC) por la de beca parcial concedida para la realización del a pasantía en el CDC; al Ministerio de Salud Pública (MSP), al Programa Nacional de Control y Vigilancia de la Enfermedad de Chagas en Ecuador (PNCh) (Dr. Prado, Dr. Quinde y Dr. Monroy) y al Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (Dr. Peñaherrera, Dr. Riofrío, Dr. Guerrero, Dr. Guerra y Dr. Peralta).

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|------|
| Agradecimientos | v |
| Tabla de contenidos | viii |
| Lista de Figuras | xvii |
| Lista de Tablas | xxi |
| Lista de Anexos | xxiv |
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Abstract | 4 |
| 3. Introducción | 7 |
| 3.1. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas | 7 |
| 3.1.1. Antecedentes..... | 7 |
| 3.1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> y Reservorios..... | 9 |
| 3.1.3. Otras Vías de Transmisión..... | 11 |
| 3.1.4. Aspectos Clínicos | 12 |
| 3.1.5. Diagnóstico y Tratamiento..... | 13 |
| 3.2. Iniciativas de Control de la Enfermedad de Chagas en Países del Continente Americano | 15 |
| 3.2.1 Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR)..... | 16 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.2. Iniciativa de los Países de América Central (IPCA)..... | 17 |
| 3.2.3. Iniciativa de los Países Andinos (IPA)..... | 18 |
| 3.2.4. Iniciativa de Vigilancia y Prevención de la Enfermedad de Chagas en la Amazonía (AMCHA)..... | 19 |
| 3.2.5. Situación de la Enfermedad de Chagas en Países no Endémicos..... | 21 |
| 3.2.6. Situación de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador..... | 21 |
| 3.3. Insectos Transmisores de la Enfermedad de Chagas..... | 23 |
| 3.3.1. Clasificación y Sistemática..... | 23 |
| 3.3.2. Ciclo de Vida de los Triatomíneos..... | 27 |
| 3.3.3. Hábitats de los Triatomíneos..... | 28 |
| 3.3.4. Distribución de Poblaciones de Triatomíneos en el Ecuador..... | 29 |
| 3.4. <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> (Lent y León, 1958)..... | 30 |
| 3.4.1. Generalidades y Distribución de <i>R. ecuadoriensis</i> | 30 |
| 3.4.2. Hábitat de <i>R. ecuadoriensis</i> | 31 |
| 3.4.3. Morfología y Ciclo de vida de <i>R. ecuadoriensis</i> | 33 |
| 3.5. Genotipo y Fenotipo..... | 34 |
| 3.5.1. Patrones Morfológicos – Fenotipo..... | 35 |
| 3.5.1.1. Sistema Sensorial de los Insectos: Fenotipo Antenal..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.1.2. Morfometría | 39 |
| 3.5.1.2.1. Morfometría Geométrica (MG) de Hemiélitro..... | 41 |
| 3.5.2. Plasticidad Fenotípica..... | 42 |
| 3.5.3. Cruces experimentales - Primera Generación (F1)..... | 43 |
| 3.5.4. Marcadores Moleculares – Genotipo..... | 46 |
| 3.5.4.1. Genética de Poblaciones en Insectos..... | 48 |
| 3.5.4.2. Gen Mitocondrial (mt Cyt b)..... | 49 |
| 3.5.4.2.1 Características..... | 49 |
| 3.5.4.2.2. Diversidad Genética o Variabilidad Genética..... | 50 |
| 3.5.4.2.3. Índices de Diferenciación Genética..... | 51 |
| 3.5.4.3. Microsatélites..... | 52 |
| 3.5.4.3.1. Características..... | 52 |
| 3.5.4.3.2. Determinación de la Estructura Poblacional y Estadísticos F..... | 56 |
| 3.6.Importancia de Investigar <i>R. ecuadoriensis</i> Transmisor de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador..... | 57 |
| 3.7. Objetivo General..... | 60 |
| 3.7.1. Objetivos Específicos..... | 60 |
| 4. Materiales y métodos..... | 65 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1. Área de estudio..... | 65 |
| 4.1.1. Provincia de Manabí..... | 65 |
| 4.1.2. Provincia de Loja..... | 66 |
| 4.2. Colecta de triatominos - <i>R. ecuadoriensis</i>..... | 67 |
| 4.2.1. Recoleccion de Triatominos en el área Sinantrópica (Domicilio- Peridomicilio)..... | 68 |
| 4.2.2. Recoleccion de Triatominos en el área Silvestre..... | 71 |
| 4.2.3 Contaje de triatominos recolectados en el campo | 72 |
| 4.3. Identificación Taxonómica y Análisis de Triatominos..... | 72 |
| 4.4. Índices Entomológicos..... | 73 |
| 4.5. Selección del tamaño de la Muestra para las Diferentes Técnicas..... | 74 |
| 4.6. Análisis del Fenotipo..... | 76 |
| 4.6.1. Análisis de Fenotipo Antenal..... | 76 |
| 4.6.1.1. Análisis Estadístico de Fenotipo Antenal..... | 77 |
| 4.6.2. Análisis del Hemiélitro Derecho: Morfometría Geométrica..... | 78 |
| 4.6.2.1. Procesamiento de datos: Superposición de Procrusters en el Análisis del Tamaño y Conformación del ala..... | 79 |
| 4.6.2.2. Análisis Estadístico de la Morfometría Geométrica..... | 81 |
| 4.7. Obtención de la Primera Generación (F1) de <i>R. ecuadoriensis</i>..... | 82 |

| | |
|--|----|
| 4.7.1. Análisis Estadístico de la Primera Generación (F1) de <i>R. ecuadoriensis</i> | 83 |
| 4.8. Análisis del Genotipo | 84 |
| 4.8.1. Aislamiento y Purificación del ADN de <i>R. ecuadoriensis</i> | 84 |
| 4.8.2. Gen Mitocondrial Citocromo B (mt Cyt b)..... | 85 |
| 4.8.2.1. Condiciones de Amplificación..... | 85 |
| 4.8.2.2. Análisis de las Secuencias obtenidas mediante mt Cytb..... | 87 |
| 4.8.2.3. Variabilidad y Diferenciación Genética..... | 88 |
| 4.8.2.4. Flujo Génico (Nm) y Estimadores F_{ST} | 90 |
| 4.8.2.5. Dendrogramas Filogenéticos..... | 91 |
| 4.8.3. Marcador Nuclear – Microsatélites..... | 92 |
| 4.8.3.1. Condiciones de Amplificación..... | 93 |
| 4.8.3.2. Determinación de Alelos..... | 94 |
| 4.8.3.3. Análisis de Microsatélites..... | 94 |
| 4.8.3.4. Índice de Heterocigocidad..... | 96 |
| 4.8.3.5. Índice de Fijación F_{ST} y Diversidad Genética..... | 97 |
| 4.8.3.6. Índice de Endogamia F_{IS} | 98 |
| 4.8.3.7. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)..... | 99 |
| 4.8.3.8. Análisis de variancia Molecular (AMOVA)..... | 99 |

| | |
|---|------------|
| 4.8.3.9. Aislamiento por distancia..... | 99 |
| 5. Resultados..... | 101 |
| 5.1. Indicadores entomológicos en las Comunidades Escogidas en la Provincia de Loja | 101 |
| 5.2. Indicadores entomológicos en las Comunidades Escogidas en la Provincia de Manabí..... | 102 |
| 5.3. Análisis del Fenotipo Antenal de <i>R. ecuadoriensis</i>..... | 104 |
| 5.3.1. Fenotipo Antenal de <i>R. ecuadoriensis</i> | 104 |
| 5.3.1.1. Variación Geográfica de Fenotipo Antenal de <i>R. ecuadoriensis</i> | 105 |
| 5.3.1.2. Dimorfismo Sexual en el Fenotipo Antenal de <i>R. ecuadoriensis</i> | 105 |
| 5.3.1.3. Variación por Hábitat de Fenotipo Antenal de <i>R. ecuadoriensis</i> | 106 |
| 5.3.1.4. Comparación en el Fenotipo Antenal entre tres especies del Complejo <i>pallenscens</i> | 107 |
| 5.4. Morfometría Geométrica del Hemiélitro Derecho de <i>R. ecuadoriensis</i>..... | 108 |
| 5.4.1. Variación Geográfica del Tamaño (CS) del Ala de <i>R. ecuadoriensis</i> | 108 |
| 5.4.2. Dimorfismo Sexual del Tamaño de Alas de <i>R. ecuadoriensis</i> | 108 |
| 5.4.3. Variación del Tamaño (CS) de Alas de <i>R. ecuadoriensis</i> por hábitat..... | 108 |
| 5.4.4. Variación Geográfica y Sexual de la Conformación de Alas de <i>R. ecuadoriensis</i> | 109 |
| 5.4.5. Variación de la Conformación de Alas de <i>R. ecuadoriensis</i> por hábitat..... | 109 |

| | |
|--|------------|
| 5.5. Cruces Experimentales - Primera Generación (F1) de <i>R. ecuadoriensis</i>..... | 111 |
| 5.5.1. Ciclo Reproductivo, tiempo de Pre-oviposición, Viabilidad y tamaño de huevos de <i>R. ecuadoriensis</i> | 111 |
| 5.5.2. Análisis Morfométrico de Alas de la Primera Generación (F1)..... | 112 |
| 5.6. Análisis del Genotipo de <i>R. ecuadoriensis</i>..... | 114 |
| 5.6.1. Gen Mitocondrial Citocromo B (mt Cyt b) de <i>R. ecuadoriensis</i> | 114 |
| 5.6.1.1. Gen Mitocondrial Citocromo B (mt Cyt b) de <i>R. ecuadoriensis</i> en las provincias de Manabí y Loja..... | 114 |
| 5.6.1.2. Estimadores de la Variabilidad Genética de Poblaciones de <i>R.</i> <i>ecuadoriensis</i> en las provincias de Manabí y Loja..... | 115 |
| 5.6.1.3. Neutralidad Selectiva Tajima's <i>D</i> en poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> | 115 |
| 5.6.1.4. Haplotipos obtenidos en Poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> en las provincias de Manabí y Loja..... | 116 |
| 5.6.1.5. Diferenciación Genética (G_{ST}) y Flujo Génico (N_m)..... | 118 |
| 5.7. Microsatélites..... | 119 |
| 5.7.1. Transferencia y Análisis de Microsatélites..... | 119 |
| 5.7.2. Estructura Poblacional..... | 122 |
| 5.7.3. Índice de Heterocigocidad-Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW)..... | 122 |
| 5.7.4. Índice de Fijación (F_{ST})..... | 123 |
| 5.7.5. Índice de Endogamia (F_{IS})..... | 125 |

| | |
|---|------------|
| 5.7.6. Análisis de Variancia Molecular (AMOVA)..... | 125 |
| 5.7.7. Efecto del Aislamiento Genético por Distancia en las provincias de Manabí y Loja..... | 126 |
| 6. Discusión..... | 127 |
| 6.1. Índices entomológicos en las comunidades escogidas en la Provincia de Loja..... | 129 |
| 6.2. Índices entomológicos en las comunidades escogidas en la Provincia de Manabí..... | 132 |
| 6.3. Análisis de Fenotipo de <i>R. ecuadoriensis</i>..... | 136 |
| 6.3.1. Análisis de Fenotipo Antenal de <i>R. ecuadoriensis</i> | 137 |
| 6.3.2. Morfometría Geométrica Alar de <i>R. ecuadoriensis</i> | 141 |
| 6.4. Primera Generación (F1) de <i>R. ecuadoriensis</i>..... | 144 |
| 6.5. Análisis del Genotipo de <i>R. ecuadoriensis</i>..... | 149 |
| 6.5.1. Gen Mitocondrial B (mt Cyt b) de <i>R. ecuadoriensis</i> | 149 |
| 6.5.2. Microsatélites de <i>R. ecuadoriensis</i> | 155 |
| 6.6. Comparación de los Resultados Obtenidos mediante los índices entomológicos, cruces experimentales, técnicas Fenotípicas y técnicas Moleculares..... | 159 |
| 7. Literatura Citada..... | 166 |
| 8. Figuras..... | 193 |

| | |
|------------------------|------------|
| 9. Tablas..... | 236 |
| 10. Anexos..... | 266 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Mapa de riesgo de la transmisión de la Enfermedad de Chagas (ECh) a Nivel Mundial..... | 194 |
| Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> en el insecto vector y en el vertebrado mamífero..... | 195 |
| Figura 3. Aparatos bucales.- Comparación de los aparatos bucales dependiendo del tipo de alimentación..... | 196 |
| Figura 4. Comparación de las cabezas de los géneros <i>Triatoma</i> , <i>Panstrongylus</i> y <i>Rhodnius</i> | 197 |
| Figura 5. Largo del cuerpo (mm) de hembras de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> de las Provincias de Loja y Manabí..... | 198 |
| Figura 6. Mapa de las provincias (Manabí) y (Loja), en las que se colectaron los especímenes de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> | 199 |
| Figura 7. Mapa de la provincia de Manabí (Centro-Costa), indicando la localización de las comunidades en las que se recolectaron los especímenes de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> | 200 |
| Figura 8. Mapa de la provincia de Loja (Sur-Andina), indicando la localización de las comunidades en las que se recolectaron los especímenes de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> | 201 |
| Figura 9. Recolección de Triatominos en el hábitat sinantrópico (domicilio y peridomicilio)..... | 202 |
| Figura 10. Recolección de Triatominos en el hábitat silvestre..... | 203 |

| | |
|--|-----|
| Figura 11. Tipo de sensilla antenal en cada segmento de la antena de <i>R. ecuadoriensis</i> | 204 |
| Figura 12. Vista dorsal del hemiélitro o ala derecha de <i>R. ecuadoriensis</i> | 205 |
| Figura 13. Ilustración en barras de la variación geográfica de fenotipo antenal de poblaciones <i>R. ecuadoriensis</i> (machos y hembras) recolectados en las provincias de Loja y Manabí..... | 206 |
| Figura 14. Variación a nivel geográfico y por hábitat de fenotipo antenal de hembras de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> en las provincias de Manabí y Loja..... | 207 |
| Figura 15. Variación a nivel geográfico y por hábitat del fenotipo antenal de machos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> en las dos provincias..... | 208 |
| Figure 16. Dimorfismo sexual de fenotipo antenal de poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> en las provincias de Loja..... | 209 |
| Figura 17. Análisis Discriminante y Distancias Fenéticas entre hembras del hábitat silvestre de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> (Manabí y Loja) <i>R. pallescens</i> y <i>R. colombiensis</i> | 210 |
| Figura 18. Variación geográfica y sexual en el tamaño (CS) del hemiélitro derecho de <i>R. ecuadoriensis</i> | 211 |
| Figura 19. Dimorfismo sexual en el tamaño del ala (CS) en los especímenes colectados en Loja y Manabí..... | 212 |
| Figura 20. Variación en tamaño de ala (CS) de poblaciones <i>R. ecuadoriensis</i> por Hábitat en las provincias de Loja y Manabí..... | 213 |

| | |
|--|-----|
| Figura 21. Loja Dendrograma UPGMA derivadas de las distancias de Mahalanobis de las alas de hembras y machos en los tres hábitats..... | 214 |
| Figura 22. Manabí Dendrograma UPGMA derivadas de las distancias de Mahalanobis de las alas de hembras y machos de los tres hábitats..... | 215 |
| Figura 23. Primera Generación (F1): Análisis Discriminante y Distancias Fenéticas de hembras de <i>R. ecuadoriensis</i> de las dos provincias (Manabí y Loja) y las obtenidas durante el cruzamiento entre estas poblaciones..... | 216 |
| Figura 24. Primera Generación (F1): Análisis Discriminante y Distancias Fenéticas de machos de <i>R. ecuadoriensis</i> de las dos provincias (Manabí y Loja) y las obtenidas durante el cruzamiento entre estas poblaciones..... | 217 |
| Figura 25. Dendrograma de Haplotipos obtenidos en las 168 muestras de <i>R. ecuadoriensis</i> | 218 |
| Figura 26. Red de Haplotipos obtenidos en las 168 muestras de <i>R. ecuadoriensis</i> ... | 219 |
| Figura 27. Tamaño de los fragmentos en pares de pases (pb) en los locus L9 y L25..... | 220 |
| Figura 28. Tamaño de los fragmentos en pares de pases (pb) en los locus L3 y L43..... | 221 |
| Figura 29. Tamaño de los fragmentos en pares de pases (pb) en los locus L47..... | 222 |
| Figura 30. Tamaño de los fragmentos en pares de pases (pb) en los locus L13..... | 223 |
| Figura 31. Distribución de dos microsatélites polimórficos (L13 y L47) amplificados en los 333 especímenes de <i>R. ecuadoriensis</i> | 224 |

| | |
|---|-----|
| Figura 32. Frecuencia de Alelos obtenidos en el microsatélite L13 polimórfico de <i>R. ecuadoriensis</i> en los tres hábitats de la provincia de Loja..... | 225 |
| Figura 33. Frecuencia de Alelos obtenidos en el microsatélite L13 polimórfico de <i>R. ecuadoriensis</i> en los tres hábitats de la provincia de Manabí..... | 226 |
| Figura 34. Frecuencia de Alelos obtenidos en el microsatélite L47 polimórfico de <i>R. ecuadoriensis</i> en los tres hábitats de la provincia de Loja..... | 227 |
| Figura 35. Frecuencia de Alelos obtenidos en el microsatélite L47 polimórfico de <i>R. ecuadoriensis</i> en los tres hábitats de la provincia de Manabí..... | 228 |
| Figura 36. Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) de los dos microsateclites polimórficos en los tres diferentes hábitats en la provincias de Loja y Manabí..... | 229 |
| Figure 37. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de los dos microsateclites polimórficos (L13, L47) de los tres hábitats de las provincias de Loja y Manabí.... | 230 |
| Figura 38. Estructura espacial y genética de <i>R. ecuadoriensis</i> en la provincia de Manabí..... | 231 |
| Figura 39. Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) utilizando dos microsateclites polimórficos en las comunidades de la provincia de Manabí..... | 232 |
| Figura 40. Estructura espacial y genética de <i>R. ecuadoriensis</i> en la provincia de Loja..... | 233 |
| Figura 41. Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) utilizando dos microsateclites polimórficos en las comunidades de la provincia de Loja..... | 234 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Localización Geográfica de las poblaciones analizadas de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> | 236 |
| Tabla2. Diez y seis cruces entre especímenes de <i>R. ecuadoriensis</i> de Loja y Manabí. | 237 |
| Tabla 3. Información de los Loci de <i>Rhodnius pallescens</i> para la evaluación de polimorfismo y análisis de mircrosatélites en <i>R. ecuadoriensis</i> | 238 |
| Tabla 4. Índices entomológicos por Triatominos obtenidos en los hábitats sinantrópicos (domicilio y peridomicilio) en 13 comunidades de la Provincia de Loja..... | 239 |
| Tabla 5. Índices entomológicos de <i>R. ecuadoriensis</i> obtenidos en el hábitat domiciliar en 13 comunidades de la Provincia de Loja..... | 240 |
| Tabla 6. Índices entomológicos de <i>R. ecuadoriensis</i> obtenidos en el hábitat peridomiciliar en 13 comunidades de la Provincia de Loja..... | 241 |
| Tabla 7. Índices entomológicos por Triatominos obtenidos en el hábitat silvestre en 5 comunidades de la Provincia de Loja..... | 242 |
| Tabla 8. Índices entomológicos por Triatominos obtenidos en los hábitats sinantrópicos (domicilio+ peridomicilio) en 8 comunidades del Cantón Portoviejo, Provincia de Manabí..... | 243 |
| Tabla 9. Índice entomológicos de <i>R. ecuadoriensis</i> obtenidos en el hábitat domiciliar en 8 comunidades del Cantón Portoviejo, Provincia de Manabí..... | 244 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 10. Índice entomológicos de <i>R. ecuadoriensis</i> obtenidos en el hábitat peridomiciliar en 8 comunidades del Cantón Portoviejo, Provincia de Manabí..... | 245 |
| Tabla 11. Cálculo de Indicadores entomológicos por Triatomíneos obtenidos en el hábitat silvestre en 2 comunidades de la Provincia de Manabí..... | 246 |
| Tabla 12. Promedios y Desviación estándar del número de fenotipos antenales de <i>R. ecuadoriensis</i> separados por sexo y por hábitat en la provincia de Loja..... | 247 |
| Tabla 13. Promedios y Desviación estándar del número de fenotipos antenales de <i>R. ecuadoriensis</i> separados por sexo y por hábitat en la provincia de Manabí..... | 248 |
| Tabla 14. Promedios y Desviación estándar del número de fenotipos antenales de <i>R. ecuadoriensis</i> separados por sexo y por región..... | 249 |
| Tabla 15. Promedios y Desviación estándar del número de fenotipos antenales de <i>R. ecuadoriensis</i> de Loja y Manabí, <i>R. colombiensis</i> y <i>R. pallescens</i> | 250 |
| Tabla 16. Disparidad Métrica (MD) de la conformación alar de <i>R. ecuadoriensis</i> entre los hábitats y género de las dos provincias..... | 251 |
| Tabla 17. Resumen de la comparación entre las variables fenotípicas de <i>R. ecuadoriensis</i> a nivel geográfico, hábitats sinantrópicos y selvático y género..... | 252 |
| Tabla 18. Viabilidad, tamaño de huevos y tiempo de pre-ovoposición obtenidos en los diez y seis cruces entre especímenes de <i>R. ecuadoriensis</i> recolectados en Loja y Manabí..... | 253 |
| Tabla 19. Resumen de los índices de diversidad genética del segmento del gene mt Cyt b (670 pb) de <i>R. ecuadoriensis</i> colectados en las Provincias de Loja y Manabí.... | 254 |
| Tabla 20. Resumen del Test de Neutralidad obtenido de las poblaciones <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> colectados en las Provincias de Loja y Manabí..... | 255 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 21. Haplotipos, Frecuencia y porcentaje (%) de la presencia de haplotipos de <i>R. ecuadoriensis</i> colectados en las Provincias de Loja y Manabí..... | 256 |
| Tabla 22. Cálculos de diferenciación genética e índice de fijación entre poblaciones y subpoblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> | 259 |
| Tabla 23. Microsatélites de <i>R. pallescens</i> utilizados en poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> de las provincias de Loja y Manabí..... | 261 |
| Tabla 24. Evaluación de los dos microsatélites polimórficos (L13, L47) amplificados en 333 especímenes de <i>R. ecuadoriensis</i> pertenecientes a Manabí y Loja..... | 262 |
| Tabla 25. Distancias genéticas entre las dos poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> en los tres hábitats estimadas por el método de Nei (1978)..... | 263 |
| Tabla 29. Análisis de la Variancia Molecular..... | 264 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|-----|
| Anexo 1. Consentimiento informado..... | 266 |
| Anexo 2. Encuesta de Vivienda..... | 267 |
| Anexo 3. Ficha Entomológica..... | 268 |
| Anexo 4. Ficha de Visita..... | 269 |
| Anexo 5. Ficha de Búsqueda Silvestre..... | 270 |
| Anexo 6. Ficha de Contaje de Triatomíneos recolectados en el ambiente sinantrópico (domicilio – peridomicilio)..... | 271 |
| Anexo 7. Ficha de Contaje de Triatomíneos recolectados en el ambiente silvestre... | 272 |
| Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de <i>R. ecuadoriensis</i> analizados en este estudio de la provincia de Loja..... | 273 |
| Anexo 9. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de <i>R. ecuadoriensis</i> analizados en este estudio de la provincia de Manabí..... | 288 |
| Anexo 10. Resultados del análisis de Fenotipo antenal de los Especímenes de <i>R. ecuadoriensis</i> utilizados en este estudio | 297 |
| Anexo 11. Resultados del análisis de Fenotipo antenal de los Especímenes del “complejo <i>pallens</i> ” utilizados para el análisis de Fenotipo antenal..... | 302 |
| Anexo 12. Programa COOW permite ordenar la información y coleccionar los puntos de referencia (landmarks) de las alas de Triatomíneos para estudios de morfometría. | 304 |

| | |
|--|-----|
| Anexo 13. El programa TETwin permite concatenar los datos, y verificar la información para comenzar los análisis de morfometría geométrica alar de Triatominos..... | 305 |
| Anexo 14. El programa MOGwin permite obtener el tamaño centroide (CS), además de separar, trasladar y rotar los puntos para realizar el análisis de morfometría geométrica alar de Triatominos..... | 306 |
| Anexo 15. Protocolo de extracción de ADN de Triatominos con el kit DNAeasy..... | 307 |
| Anexo 16. Procedimiento de purificación Millipore Multiscreen HTS..... | 309 |
| Anexo 17. Protocolo a seguir para el proceso del ciclo de secuenciación o cycle sequencing..... | 310 |
| Anexo18. Protocolo a seguir en el proceso de purificación Centri-SEP..... | 311 |
| Anexo 19.- Programa SeqMan permite ensamblar y alinear las secuencias (Forward y Reverse) para análisis de gen mitocondrial (mt Cyt b)..... | 313 |
| Anexo 20. Programa Bioedit que permite alinear las secuencias obtenidas para el análisis de gen mitocondrial (mt Cyt b)..... | 314 |
| Anexo 21. Programa GeneMapper permite la genotipificación y provee el tamaño y alelos del fragmento de ADN que se desea determinar en cada espécimen..... | 315 |
| Anexo 22. Continuación del Programa GeneMapper permite la genotipificación y provee el tamaño y alelos del fragmento de ADN (pares de base) que se desea determinar en cada espécimen..... | 316 |

| | |
|---|-----|
| Anexo 23. Tamaño del fragmento en pares de bases (pb) de los alelos de individuos de <i>R. ecuadoriensis</i> de Manabí y Loja..... | 317 |
| Anexo 24. Lista de publicaciones realizadas durante los cinco años de doctorado (2006-2011)..... | 328 |

1. RESUMEN

Los estudios de morfometría, como los análisis moleculares, son herramientas que contribuyen al conocimiento de la estructura genética de los triatomíneos y generan información valiosa que ayuda a establecer estrategias de control. La información disponible de *Rhodnius ecuadoriensis* ha sido muy limitada. Durante los últimos años, el hallazgo de esta especie colonizando diferentes micro-ambientes en dos provincias del Ecuador (Loja y Manabí) con condiciones climáticas totalmente distintas, ha despertado el interés de ampliar su conocimiento y comprender su proceso de adaptación. Éste estudio comparó las poblaciones de *R. ecuadoriensis* encontradas en diferentes micro-ambientes (silvestre, peridomiciliar y domiciliar) en dos provincias endémicas para la Enfermedad de Chagas en el Ecuador, utilizando como herramientas de investigación: fenotipo antenal, morfometría geométrica alar, cruces experimentales y marcadores moleculares (mt ADN - Cyt b- y microsatélites). En cuanto al fenotipo se evidenció los siguientes aspectos: (i) Un marcado dimorfismo sexual en el tamaño alar en todas las sub-poblaciones ($p < 0.001$), presentando un mayor tamaño en las alas de las hembras. (ii) En el fenotipo antenal, el dimorfismo sexual solo fue evidente en hembras del hábitat domiciliar de Loja ($p < 0.006$). (iii) La geometría alar y el fenotipo antenal diferenciaron claramente las dos poblaciones geográficas de *R. ecuadoriensis* ($p < 0.001$). En cuanto al cruzamiento entre las dos poblaciones, se demostraron resultados: (i) Éxito en los cruces de un 87,5%. (ii) Viabilidad de un 32% de los huevos puestos por cruce. (iii) El tamaño alar de especímenes de Manabí, tanto en hembras y machos, fue mayor que los de Loja (parentales) y en la primera generación (F1) se encontró un tamaño alar compartido con los parentales (52% en hembras y 82% en machos). Referente a la estructura y variabilidad genética, los resultados del mt Cyt b, muestran: (i) Existencia de una moderada diferenciación genética

$G_{ST} = 0.05460$ entre las poblaciones de las dos provincias. (ii) Evidencia de flujo génico, $N_m = 2,24$, (iii) 36 haplotipos, 15 exclusivos en Loja y 18 en Manabí y tres haplotipos compartidos entre las dos poblaciones. (iv) Una tercera población bien marcada conformada con individuos de un solo cantón (Catamayo, Loja). En cuanto a los resultados de los microsatélites, solo dos microsatélites fueron polimórficos (L13 y L47), y obtuvieron: (i) Un índice de fijación $F_{ST} = 0,191$; con un Número de migrantes (N_m) que oscila entre 1 y 2 individuos por generación entre las dos provincias. (ii) Existe una pequeña diferenciación entre las subpoblaciones (hábitats). Los resultados a nivel del fenotipo sugieren las siguientes conclusiones: (i) Las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Manabí y Loja están geográficamente aisladas. (ii) Tienen diferente grado de adaptación al domicilio humano por la presencia de colonias intradomiciliares en Loja a diferencia que en Manabí. (iii) La regla de Bergmann no se aplica en este estudio. Respecto a los resultados del cruzamiento entre las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis*, sugiere que puede existir (i) Interferencia en el desarrollo embrionario. (ii) Infertilidad ya sea de machos o de hembras. (iii) Esterilidad del híbrido, y/o (iv) Aislamiento geográfico. A nivel de estructura genética poblacional de *R. ecuadoriensis*, se concluye que existe flujo génico entre las dos provincias (N_m y la diferenciación genética- G_{ST}), que implicaría la influencia antropogénica (transporte pasivo) en la dispersión del vector, y muestra una tercera población bien marcada genéticamente en la provincia de Loja. Finalmente, en este estudio se observa claramente que el ambiente influye en la diferenciación del fenotipo, sin la necesidad de actuar sobre el genotipo de esta especie en las dos provincias. Esta investigación sobre el fenotipo y genotipo de *R. ecuadoriensis* junto con estudios de ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación, y comportamiento, sustenta la hipótesis de una selección disruptiva que actúa sobre las poblaciones de esta especie y probablemente el aislamiento geográfico y las rutas de dispersión nos permite señalar a *R. ecuadoriensis*

como un vector de gran importancia epidemiológica, y considerarla como especie primaria en ambas regiones.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, Estructura poblacional, Fenotipo antenal, Microsatélites, Morfometría geométrica, mt Cyt b, *Rhodnius ecuadoriensis*, Ecuador.

2. ABSTRACT

Morphometric and molecular analyses contribute to generate knowledge about the relationships between different populations of triatomines, and generate valuable information for the design and evaluation of Chagas Disease control strategies. The information about *Rhodnius ecuadoriensis* has been very limited. During the past few years, the finding of this species colonizing different micro-habitats in two provinces of Ecuador (Loja and Manabí) with different climatic conditions, prompted the interest to understand the capacity of this vector to adapt at the different habitats and the relationships between populations between and within two Ecuadorian provinces. This study compared the populations of *R. ecuadoriensis* found in different habitats (sylvatic, peridomicile and domicile) in two Chagas disease endemic provinces in Ecuador by analyzing antennal sensilla phenotype, wing geometric morphometry, molecular markers (mt DNA Cyt b - and microsatellites) and experimental crosses. In this study, we demonstrated that in the phenotype: (i) Noticeable sexual dimorphism in the size of the wing in all the sub-populations ($p < 0,001$), displaying that the females wings presented a larger size. (ii) In the antennal phenotype, a sexual dimorphism was evident only in the females of Loja domicile ($p < 0,006$), (iii) the phenotypic variability (wing geometry and antennal phenotype), differentiated clearly the two geographic populations of *R. ecuadoriensis* ($p < 0,001$). As far as, the crosses between the two populations demonstrated that: (i) 87.5% of the crosses were successful; (ii) a 32% of the eggs were viable; and (iii) the wings of both gender (females and males) from Manabí were larger than in those from Loja (parental), and in the first generation (F1), presented a sharing size (52% in females and 82% in males) between the both populations. The genetic structure analyses of mt Cyt b, showed that (i) a moderate genetic differentiation ($G_{ST} = 0,05460$) between the populations of the

two provinces; (ii) evidence of genetic flow ($N_m = 2.24$); (iii) 36 haplotypes, 15 exclusive in Loja and 18 in Manabí, and three shared haplotypes between the two populations; and (iv) a third genetically different group within Loja province (Catamayo county) was found. As far as the results of the microsatellites, only two microsatellites were polymorphic (L13 and L47), and showed (i) a fixation index $F_{ST} = 0.191$; with a number of migrants (N_m) that oscillates between 1 and 2 individuals per generation; (ii) A small genetic difference between the subpopulations (habitats) was showed. These results suggest that the *R. ecuadoriensis* populations from Loja and Manabí (i) are geographically isolated; (ii) show a different adaptive capacity to the human environment, showing this behavior in Loja province, but not in Manabí; (iii) Bergmann rule, didn't apply in to these populations. The results of the crosses between the two populations of *R. ecuadoriensis*, suggests that can exist (i) interference in the embryonic development, (ii) infertility of the males or females, (iii) sterility of the hybrid, and/or (iv) a geographic isolation. The population structure of *R. ecuadoriensis* suggests (i) that introgression exists between the two populations (N_m - genic flow and the genetic differentiation $-G_{ST}$), that could be explained with the anthropogenic influence (passive transport) in the dispersion of the vector. And showed the existence of a third genetically different group within the Loja province. Altogether, these data indicates that the environment influences the differentiation of the phenotype, without the necessity to act on the genotype of these two populations. The results obtained to date regarding the phenotype, genotype, lifecycle, feeding and defecation patterns, and the behavior of *R. ecuadoriensis* support the hypothesis of disruptive selection acting upon populations of this species, probably due to geographical isolation and routes of dispersion, and point out that this species is at present the main vector of Chagas Disease in these two provinces.

Key words: Chagas Disease, Population structure, Antennal Phenotype, Microsatellites, Geometric Morfometric wing, mt Cyt b, *Rhodnius ecuadoriensis*, Ecuador.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.1.1. ANTECEDENTES

La Enfermedad de Chagas (ECh), fue nombrada en honor al médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934) quién describió en 1909 (Chagas, 1909) todos los elementos de la transmisión de esta enfermedad en un mismo tiempo, contribuyendo de esta manera a la ciencia médica del siglo XX en América Latina (Moncayo y Silveira, 2009). Esta enfermedad también se la conoce como Trypanosomiasis Americana, ya que su transmisión vectorial es exclusiva del continente Americano. Es una enfermedad parasitaria, causada por el protozoo flagelado, *Trypanosoma cruzi* (Moncayo, 2004), es transmitido a humanos y otros mamíferos (hospederos-reservorios) principalmente a través de la deyección de insectos hemípteros hematófagos (vectores), pertenecientes a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (Coura, 2007) conocidos en Ecuador como “chinchorros” o “chinchas”.

Originalmente, la ECh fue considerada como una enfermedad enzoótica y, como tal, existe en el medio natural (ambientes silvestres) (Abad-Franch, 2007). Para ser considerada como enfermedad enzoótica, se cree que tuvieron que haber pasado las poblaciones humanas precolombinas por dos modalidades (i) las poblaciones nómadas se introdujeron en los ecotopos de la enfermedad y las personas resultaron infectadas, al entrar en contacto con los vectores en su movimiento continuo en búsqueda de alimento (Guhl *et al.*, 2000), y en la otra modalidad, (ii) se piensa que tuvo que haber ocurrido

cuando las poblaciones humanas se hicieron sedentarias y construyeron sus viviendas de una manera semi-permanente o permanente; en esos casos, comenzaron con un conjunto de modificaciones en el medio ambiente, ya que la sedentarización significaba construcción de viviendas, existencia de animales domésticos y un proceso de deforestación de tierras para el cultivo de alimentos; facilitando de esa manera posibles formas de transmisión vectorial ya sea la primera de manera intermitente, en la cual los vectores pueden acercarse temporalmente a las viviendas en busca de alimentos sin colonizarlas (invasión o visita esporádica); y segunda por colonización de las viviendas por parte de los vectores, donde hacen de la vivienda humana un lugar de permanencia (Briceño-León, 2009) en busca de alimento, refugio y reproducción.

Cien años después de su descubrimiento se han hecho grandes avances en el control de la enfermedad, pero también han aparecido nuevos problemas. Los cambios que se dan en la sociedad y en el ambiente han producido cambios en la epidemiología de la enfermedad (Sanmartino, 2009).

La ECh constituye uno de los problemas de salud pública más graves de América Latina y es considerada como una de las enfermedades parasitarias más serias del continente Americano (Schofield, 2001). Sin embargo, no se cuenta actualmente con cifras confiables que reporten la magnitud real del problema, estimando que existen al menos 8 a 10 millones de personas infectadas y de 28 millones en riesgo (Rassi y Marin-Neto, 2010). Su transmisión vectorial se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta el Sur de Argentina (Moncayo y Silveira, 2009) (Figura 1).

Para que ocurra la transmisión vectorial, el mecanismo más común de transmisión, se requiere de un conjunto de condiciones ambientales y sociales que permitan que esos tres factores (parásito, vector, hospedero - reservorio) puedan encontrarse (Coura, 2007; Briceño-León, 2009). El parásito, *T. cruzi*, es un protozooario hemoflagelado, que se encuentra en el intestino de insectos triatominos hematófagos, conocidos en el Ecuador como “chinchorros” o “chinchas”, éste es transmitido a mamíferos (reservorios) incluyendo a humanos, principalmente a través de la defecación del vector (WHO, 2002), permitiendo que el parásito entre al hospedero por el sitio de la picadura del insecto o por las membranas mucosas (Kirchhoff *et al.*, 2005). Otro parásito *Trypanosoma rangeli*, no es patogénico, sin embargo, puede producir confusión en el momento del diagnóstico. Se encuentra cercanamente relacionado con *T. cruzi* y pueden localizarse los dos en un mismo vector (De Moraes *et al.*, 2008).

3.1.2. *Trypanosoma cruzi* Y RESERVORIOS

T. cruzi presenta un ciclo vital complejo, normalmente necesita de dos huéspedes: (i) invertebrado (insecto triatomino) y (ii) el vertebrado (mamífero reservorio) en los que pueden diferenciarse cuatro estadios morfológicos: (i) Epimastigotes: que son formas replicativas en el intestino medio de los vectores; (ii) Trypomastigotes metacíclicos: que son las formas infectantes no replicativas en el intestino posterior del vector; (iii) Trypomastigotes circulantes en sangre periférica de los huéspedes mamíferos: formas extracelulares, no replicativas, que son ingeridas por los insectos al alimentarse de sangre; (iv) Amastigotes: formas intracelulares replicativas presentes en varios tejidos de los huéspedes (WHO, 2002) (Figura 2).

La infección de *T. cruzi*, ha sido documentada en más de 150 especies de 24 familias de mamíferos domésticos y silvestres, junto con el humano (Gaunt y Miles, 2000; Rozas *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2006). Entre los principales reservorios y hospederos domésticos y silvestres encontramos perros, gatos, cabras, cerdos, cuyes, conejos, zarigüeyas, ratas, ratones, armadillos, murciélagos, primates, entre otros, al igual que el ser humano (WHO, 2002). *Didelphis marsupialis* (la zarigüeya común, zorro o raposa) es el principal reservorio (probablemente ancestral) de *T. cruzi*, y puede también actuar como vector, ya que el parásito es capaz de completar su ciclo vital en las glándulas anales de estos marsupiales, postulándose que en la antigüedad la glándula anal y la orina de este animal habrían permitido la transmisión de *T. cruzi* entre los marsupiales silvestres (Deane *et al.*, 1984; Schofield, 2000a; WHO, 2002). En ambientes silvestres éstos y otros mamíferos se encuentran infectados y viven en estrecho contacto con los triatominos, entre los cuales el ciclo de parásito se mantiene por la vía vectorial o cuando estos animales ingieren triatominos infectados (Orellana-Halkyer y Arriaza-Torres, 2010); o las heces de los triatominos son depositadas en el pelo del animal, ingiriendo los tripomastigotes metacíclicos en el momento del aseo (Diotaiuti *et al.*, 1995).

En cuanto a la asociación entre *T. cruzi* con el reservorio y con el vector, éste se clasifica en algunos linajes, como ejemplo de la existencia de estas asociaciones tenemos: (i) TcI es el predominante tanto en vectores como reservorios, incluyendo al ser humano (Bosseno *et al.*, 2002; Añez *et al.*, 2004; Pennington *et al.*, 2009) y marsupiales del género *Didelphis* (Yeo *et al.*, 2005; Ocaña *et al.*, 2010) como también roedores *Rattus rattus*; y vectores del género *Rhodnius* (Yeo *et al.*, 2005; Ocaña *et al.*, 2010). En cuanto a la patología de la ECh, se asocia la presencia de TcI con la cardiopatía y no con lesiones digestivas (megaesófago y megacolon) en el norte de América del Sur (Miles, 2009); como

también asociados a los diferentes ciclos de transmisión (domicilio, peridomicilio y silvestre) (Herrera *et al.*, 2007; Falla *et al.*, 2009). (ii) TcII y TcIII son los principales agentes de la ECh en el Cono Sur, y están asociados al vector *Triatoma infestans*, y a casos de megaesófago y megacolon (Miles, 2009), no obstante, parece que tienen relación con mamíferos de hábitats terrestres (Yeo *et al.*, 2005). (iii) El linaje TcIII tiene una amplia distribución a lo largo de América desde el este de Venezuela hasta el Chaco Argentino (Llewellyn *et al.*, 2009), y está asociado con armadillos (*Dasypus*, *Euphractus*) (Yeo *et al.*, 2005; Marcili *et al.*, 2009) y también con vectores de los géneros *Panstrongylus* y *Triatoma* (Miles, 2009).

La presencia de aves como gallinas, palomas favorece la colonización de vectores en ambientes silvestres y domiciliarios, las mismas que son reconocidas como importantes fuentes de alimento y refugio para los triatomíneos. No obstante, las aves no se infectan con el parásito, debido a que son refractarias al mismo (*T. cruzi* es destruido por medio del sistema del complemento) (WHO, 2002; Carcavallo *et al.*, 1998 a y b).

3.1.3. OTRAS VÍAS DE TRANSMISIÓN

Existen otras vías alternativas de transmisión que se deben tomar en cuenta, debido a la aparición de nuevos casos reflejando un mayor riesgo de contraer la enfermedad, tenemos: transmisión transfusional, transmisión congénita, transmisión por ingestión de comida contaminada (vía oral) (Schofield, 2000a), y en menor importancia, con pocos casos registrados se encuentran los accidentes de laboratorios, mantenimiento de animales (posibles reservorios) y trasplantes de órganos (Coura, 2007).

3.1.4. ASPECTOS CLÍNICOS

En cuanto a la sintomatología de la ECh, el proceso de invasión celular es progresivo y lento, y que posteriormente dañará los tejidos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera dos principales fases sucesivas: (i) aguda y (ii) la crónica. La fase aguda dura entre unos seis a ocho semanas después de la infección, los síntomas no son específicos (fiebre, inflamación en los nódulos linfáticos, reacción inflamatoria en el sitio de la picadura). Durante la infección inicial, la multiplicación del parásito puede causar una lesión cutánea u ocular, signo de Romaña (WHO, 2002) que se hace evidente en el sitio de entrada del parásito para luego, éste difundirse por el organismo (Miles, 2009). Cuando el paciente se encuentra en esta fase, no hay daño en los órganos y *T. cruzi* puede ser detectado usando métodos de diagnóstico clínicos estándar y parasitológicos (microscopía directa); ya que en esta etapa los parásitos se encuentran circulando en la sangre e invadiendo varios tipos de células nucleadas (Tarleton *et al.*, 2007).

La fase crónica de la enfermedad se inicia con una caída del nivel de parasitemia en la sangre a niveles no detectables, esta fase se manifiesta de cuatro formas: indeterminada, cardíaca, digestiva y nerviosa. La forma indeterminada aparece después de la fase aguda, ésta se caracteriza por no presentar síntomas y los parásitos no son detectables por microscopía directa. Entre el 50 al 70% de los pacientes permanecen en esta fase indeterminada toda la vida (WHO, 2002). Sin embargo, estos pacientes pueden ser considerados como reservorios y fuente de transmisión de *T. cruzi*, ya que pueden mantener cierto nivel de parásito circulando por el torrente sanguíneo.

Las formas cardíaca y digestiva, aparecen después de algunos años (5-20 años después de la fase aguda), en esta fase entre el 20 y 35% de los pacientes crónicos desarrollan lesiones irreversibles; los pacientes pueden manifestar problemas cardíacos, del megacolon y megaesófago (Moncayo y Silveira, 2009). Se desconoce las razones por las que algunos pacientes presentan síntomas y otros no. Sin embargo, se cree que características genéticas de los parásitos, así como la respuesta inmune del paciente podría ser algunos factores que influyen en la presencia de ciertas manifestación clínicas (Tarleton *et al.*, 2007; Ocaña, 2010).

3.1.5. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

En la actualidad los métodos de diagnóstico en la fase aguda (hemocultivo o xenodiagnóstico o la amplificación de los ácidos nucleicos, DNA o RNA, mediante la reacción en cadena de polimerasa) se orientan a la identificación del parásito en la sangre periférica, éste método se basa en la detección de los mismos mediante observación microscópica; mientras que en la fase crónica, por el contrario, hay escasez de parásitos en sangre y alta cantidad de anticuerpos dirigidos contra antígenos de *T. cruzi*, no obstante, la existencia de falsos positivos y falsos negativos puede ser común, lo cual dificulta su diagnóstico definitivo (WHO, 2002; Abad-Franch y Aguilar, 2003; Schijman *et al.*, 2011).

Una de las estrategias que se ha utilizado para detectar casos crónicos de la enfermedad es el uso de pruebas rápidas. Sin embargo, este tipo de pruebas han mostrado varios niveles de desempeño por lo que no se recomienda como prueba de diagnóstico. No obstante, en ciertos estudios congénitos y de campo resultó este test como una buena alternativa para detección de anticuerpos (Luquetti *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2005; Brutus

et al., 2008; Sosa-Estani *et al.*, 2008). Es imprescindible que cuando se vaya a diagnosticar la enfermedad en un paciente, no sea por medio de un solo test serológico, la OMS recomienda el uso de al menos dos pruebas serológicas diferentes para establecer un diagnóstico confirmatorio (WHO, 2002). El establecer un estricto sistema de control de calidad y de evaluación periódica externa de los procedimientos de laboratorio, es muy importante para (i) captar tempranamente los nuevos casos, (ii) comunicar asertivamente esta situación especialmente a las instancias que toma las decisiones y (iii) proporcionar un manejo médico integral a los que padecen esta enfermedad.

Si el diagnóstico de la ECh es un tema argüido, el tratamiento también requiere de atención. Para esto, es fundamental que los centros de salud locales desarrollen técnicas necesarias para un adecuado manejo del paciente con ECh. Este manejo incluye tratamiento médico (antiparasitario específico), información, orientación y educación con su respectivo seguimiento y apoyo psicológico (Amato-Neto, 1999; Meneghelli, 1999; Sosa-Estani y Segura, 1999; Coura y de Castro, 2002; WHO, 2002).

Los medicamentos para el tratamiento de la ECh comenzaron su utilización a finales de los años 60 y son: (i) nifurtimox (un derivado nitrofurano) y (ii) benznidazol (imidazólico), conocidos con nombres genéricos como Lampit (Bayer®) y Rochagan/Radanil (Roche®) respectivamente (López-Antuñano *et al.*, 2000; Ocaña, 2010). Inicialmente, se aplicaba el tratamiento a los pacientes que se encontraban tanto en fase aguda y como en la crónica (Cerisola, 1977). Sin embargo, a partir de los años 80s, el tratamiento se dejó de aplicar a enfermos crónicos, debido la escasa evidencia de la disminución de infección (Sosa-Estani, 2009). La aplicación de tratamiento de benznidazol y nifurtimox en pacientes en la fase aguda, con infecciones crónicas recientes, en niños

menores a 12 años, y pacientes con infecciones congénitas (Coura y de Castro, 2002) ha presentado resultados satisfactorios en un 70% de los pacientes tratados (Marín-Neto *et al.*, 2009).

Es de gran importancia la detección temprana, el seguimiento y supervisión médica durante el tratamiento de infecciones tanto congénitas y otras formas de transmisión, debido a que los medicamentos pueden ser severos, de eficacia limitada y altamente tóxicos (con efectos secundarios) que requieren atención especializada, de modo que, su indicación debe ser evaluada cuidadosamente (Pinto Dias *et al.*, 2002; WHO, 2002; Abad-Franch y Aguilar, 2003). El seguimiento no debe ser solo a corto, sino a mediano y largo plazo, tomando en cuenta, que los pacientes que padecen la ECh habitan en zonas endémicas y de extrema pobreza, para quienes la utilización de estos medicamentos es muy difícil.

Dadas las características de contexto dónde esta enfermedad existe, se trata de un problema complejo y profundamente socio-económico que supera los límites de la biología y medicina, para lo cual, se requiere de mucha investigación, prevención, control y tratamiento como respuesta para frenar la transmisión de este mal (Briceño-León y Galván, 2007).

3.2. INICIATIVAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN PAÍSES DEL CONTINENTE AMERICANO

Tomando en cuenta lo anteriormente dicho sobre el origen, epidemiología, síntomas, diagnóstico y tratamiento de la ECh en América Latina, la preocupación se ha

ido incrementando de tal forma que se ha formulado medidas preventivas a través de Iniciativas como: (i) Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR), (ii) Iniciativa de los Países de América Central (IPCA), (iii) Iniciativa de los Países Andinos (IPA), y (iv) la Iniciativa de Vigilancia y Prevención de la ECh en la Amazonía (AMCHA), que buscan (a) Mantener y consolidar el control de la enfermedad mediante la implementación de programas para la vigilancia eco-epidemiológica; (b) promover y proveer una efectiva atención médica y social a las personas que padecen la Enfermedad y (c) realizar investigaciones que guíen y sustenten las dos primeras áreas antes mencionadas (Pinto Dias *et al.*, 2002) en los diferentes países involucrados.

3.2.1. INICIATIVA DEL CONO SUR (INCOSUR)

La primera iniciativa, fue la Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR). Esta se inició en julio de 1991, y es considerada como una respuesta científica a un problema aún poco abordado políticamente, los programas nacionales no brindaban ni asumían las coberturas y continuidades necesarias a la población involucrada (pobre, rural, políticamente no expresiva), por la falta de recursos humanos y financieros, como también debido a la inmadurez política y las sucesivas discontinuidades gubernamentales (Pinto Dias *et al.*, 2002). Es uno de los más importantes programas de cooperación internacional contra la ECh.

Esta iniciativa abarca siete países (Argentina, Brasil, Chile, Uruguay, Paraguay, Bolivia y Perú), donde se localizan más de dos tercios de los portadores de esta enfermedad en el continente americano (WHO, 2002). Esta Iniciativa tuvo el apoyo del Banco Mundial y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), además de la unidad y

el consenso de los investigadores dedicados a la ECh de todos los países implicados. Su principal objetivo fue la eliminación del principal vector *Triatoma infestans* de los hábitats sinantrópicos (domiciliar y peridomiciliar) como también la interrupción de la transmisión transfusional mediante el mejoramiento de la red de bancos de sangre y su eficiente tamizaje a nivel regional (Dias y Schofield, 1999; WHO 2002; Reyes y Vallejo, 2008). Catorce años después de su creación y actividad, los gobiernos locales de los países involucrados anunciaron la eliminación o reducción drástica de *T. infestans*, y declararon ciertas áreas libres de transmisión por este vector en Uruguay (1997) y Chile (1999), en 13 estados de Brasil (2000-2005), en seis provincias de Argentina (2002- 2004), y un departamento en Paraguay (Dias, 2007). Adicionalmente, se fortaleció a los programas de control nacional; como también los procesos de control en calidad a nivel serológico en laboratorios de referencia de la región, se mejoró los sistemas de evaluaciones de donadores en los bancos de sangre, y desarrollaron proyectos de control con el apoyo de la OPS (Technical Cooperation-TCC) (Dias, 2007).

3.2.2. INICIATIVA DE LOS PAÍSES DE AMERICA CENTRAL (IPCA)

La segunda iniciativa es la Iniciativa de los Países de América Central (IPCA), en la cual la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centroamérica se creó para la Interrupción de la Transmisión Vectorial y Transfusional y la Atención Médica de la ECh. Esta Iniciativa se inició a la par de la IPA (1997) en la ciudad de Tegucigalpa, Honduras; con el apoyo técnico y financiero de la OPS y la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Esta iniciativa incluye a países Centroamericanos como Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá. En esta región existen 26 millones de personas que viven en áreas de

riesgo y 3.5 millones de infectados (Moncayo, 1997). Adicionalmente, en esta región, las poblaciones de triatominos no son al parecer estrictamente domiciliarias, por lo que, las estrategias de control deben adaptarse a las características entomológicas locales. El control se centra a tres especies: *Rhodnius prolixus*, *R. pallescens* y *Triatoma dimidiata*. Entre los principales avances obtenidos por esta iniciativa está la interrupción de la transmisión por *R. prolixus* en Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua y la cobertura del 100% de donantes en los bancos de sangre de Belice, El Salvador y Honduras (Moncayo y Silveira, 2009).

3.2.3. INICIATIVA DE LOS PAÍSES ANDINOS (IPA)

La tercera es la de los Países Andinos (IPA). Esta iniciativa se creó en 1997 con la finalidad de interrumpir la transmisión vectorial y transfusional en los países Andinos, como son: Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. En los países involucrados se calcula 25 millones de personas viviendo en áreas de riesgo y 2.8 millones de individuos ya infectados. Uno de los principales objetivos de esta iniciativa es el de controlar las poblaciones de *R. prolixus* y *T. dimidiata*. Como resultado de las reuniones, se tomó en cuenta los adelantos de cada uno de los países, enfocándose a las necesidades propias de cada uno de ellos (Guhl, 2007). En el caso del Ecuador, se estableció un programa para el Control y Vigilancia epidemiológica de la ECh. Sin embargo, según reportes se dio importancia solamente a estudios de *T. dimidiata* como el principal insecto transmisor en las provincias de la costa del Pacífico (El Oro, Guayas y Manabí), no obstante, *T. dimidiata* es un vector introducido de importancia, pero no se puede descartar la relevancia de la presencia de otras especies, llámense secundarias que podrían ir adquiriendo importancia epidemiológica. La falta de índices de infestación por provincia y de índices

de prevalencia por edad, como también, la falta de un programa establecido de control y vigilancia sistemática es una situación que debe ser tomada en cuenta como crucial y emergente. *R. ecuadoriensis*, ha sido considerado como vector secundario en algunas provincias y vector de importancia en otras. El Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIEI) ha venido desarrollando algunos estudios de esta especie, que deben ser consideradas para definir, diseñar y formular propuestas para el Control y Vigilancia epidemiológica de la enfermedad en el país (Grijalva *et al.*, 2005a; Villacís *et al.*, 2008; Grijalva y Villacís; 2009; Suarez-Davalos *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2010; Villacís *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2011).

3.2.4. INICIATIVA DE VIGILANCIA Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA AMAZONÍA (AMCHA)

Por último, la Iniciativa de Vigilancia y Prevención de la ECh en la Amazonía (AMCHA). Esta iniciativa es la más reciente, en Brasil en el 2002 se estableció pautas para la investigación, vigilancia y evaluación de las posibles estrategias de control de la ECh enfocadas en un área extensa, 7'275.300 km² de biodiversidad que abarca el bosque húmedo tropical de la Amazonía y con una densidad poblacional de 1.24 habitantes/km² (Aguilar *et al.*, 2007). La situación eco-epidemiológica de la ECh en esta región difiere mucho con otras áreas endémicas, debido a que la transmisión vectorial es esporádica al ser humano, muchas de las especies transmisoras habitan principalmente en el ambiente silvestre, que no pueden establecer, ni formar colonias en los ambientes sinantrópicos (domicilio y peridomicilio). Adicionalmente, la mayoría de comunidades amazónicas son constituidas por indígenas, que han ido colonizando poco a poco zonas rurales, periurbanas y urbanas, es por esta razón, que se debe tomar en cuenta las actividades socio económicas

de la poblaciones humanas como son: las silviculturales, turismo, consumo (transmisión oral) de frutos de palmeras dónde habitan los triatominos, como también la ingestión de sangre y de carne cruda o semi-cruda de reservorios de *T. cruzi* como remedio y/o prácticas culturales por parte de indígenas y colonos que ha ido aumentando los casos de infección con *T. cruzi*. Los países involucrados en esta Iniciativa son: Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Venezuela, Guyana Francesa, Guyana y Surinam (Guhl y Schofield, 2004). Esta Iniciativa tiene el apoyo de OPS/ OMS como la Secretaría Técnica (Aguilar *et al.*, 2007).

La sostenibilidad de cualquiera de las Iniciativas exige y demanda la participación de los sistemas locales de salud y de las propias comunidades (Dias, 1991, Bryan *et al.*, 1994; Espino *et al.*, 2004). Con estas Iniciativas se han obtenido avances que han permitido dar un paso adelante y poner atención a otros factores, como resaltar la importancia de especies secundarias que podrían ir invadiendo los nichos ocupados por las especies primarias, como también desarrollar resistencia a los insecticidas por parte de los triatominos. Adicionalmente, es necesario estimular a las comunidades rurales a la realización rutinaria de exámenes serológicos principalmente a la población infantil como también a madres embarazadas (Chagas congénito) en zonas endémicas. Finalmente, se debe enfatizar las campañas de prevención en escuelas y colegios (educación para la salud), promoviendo la participación en talleres donde se integren planes relacionados con la salud, que deben realizarse de manera continua y permanente (Dias, 2007).

3.2.5. SITUACION DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN PAISES NO ENDÉMICOS

La prevención y el tratamiento de la ECh en países no endémicos representan un nuevo reto para el sistema de salud pública de países principalmente europeos (Muñoz *et al.*, 2009). Estudios realizados por grupos de investigadores implicados en la prevención y tratamiento de la ECh en países endémicos se ha podido profundizar en las medidas de intervención que son necesarias para hacer frente de esta enfermedad. El diagnóstico de la ECh se ha realizado principalmente en mujeres embarazadas latinoamericanas y sus hijos. Europa es desde hace años, el lugar de acogida de inmigrantes provenientes de todo el mundo, y España, a partir de los años 80, pasa a ser también un país que acoge inmigrantes, importando esta parasitosis procedente de países endémicos (Flores-Chávez *et al.*, 2008). El primer caso conocido de transmisión fue por trasplante de médula, en 1984 (Villalba *et al.*, 1992). Sin embargo, desde 2005 se han reportado 5 casos de personas con ECh debido a transfusiones sanguíneas (Forés *et al.*, 2007; Pérez de Pedro *et al.*, 2008). Estudios realizado por Muñoz *et al.*, (2009) en Barcelona, detectó infección por *T. cruzi* en el 41 % de personas adultas latinoamericanas testadas, y de este porcentaje, la mayoría representaban a mujeres embarazadas de origen boliviano.

3.2.6. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS (ECh) EN EL ECUADOR

La prevalencia general de la infección por *T. cruzi* probablemente alcanza el 1,38% de la población general. Las encuestas serológicas en áreas consideradas endémicas reportan prevalencias de 3,03% en todas las regiones. En la Costa 2,3%; en la Región

Andina 3,25% y en la Amazonia 2,91%. Entre 165.000 y 170.000 personas son seropositivas en el país, donde las mayores tasas se reporta en las provincias de Loja y El Oro ($\geq 5\%$). En ausencia de medidas preventivas, se creería que unas 4.400 personas adquieren la infección cada año, calculando una incidencia aproximada de 36 personas por cada 100.000 habitantes por año. Los perfiles de mortalidad son de 7.7 muertes por 1.000 seropositivos por año. Unos 33.500 pacientes sufren formas crónicas sintomáticas, de entre ellas se creería que 31.700 padecen de problemas cardíacos y más de 1.670 personas padecen de problemas digestivos (Aguilar *et al.*, 1999; Abad-Franch y Aguilar, 2003; Aguilar *et al.*, 2007). El Ecuador consta de 24 provincias, las cuales abarcan 203 áreas de salud quienes informan la presencia de casos y deben proporcionar un informe al Programa Nacional de Chagas (PNCh). Sin embargo, estos datos no son cifras totalmente certeras, debido a que esta enfermedad es considerada como una enfermedad olvidada, y todavía no se ha hecho un análisis y una encuesta epidemiológica global a nivel del país para obtener una mayor información de la misma (Dr. Prado, Jefe del PNCh, comunicación personal).

El Programa Nacional de Control y Vigilancia de la ECh en el Ecuador se creó el 31 de Octubre del 2003 mediante el Acuerdo Ministerial N°. 0632 (MSP, Ecuador), sin embargo, recién en el 2005 recibió financiamiento. En 1999, la OPS establece el tamizaje obligatorio para cinco marcadores serológicos, incluyendo la ECh, en donantes y receptores de sangre y sus componentes (OPS/OMS, 1999); mientras que el 22 de diciembre del 2006 se promulga una legislación, según la Ley Orgánica de Salud Art. 73, capítulo VI, que señala que “Los hemocentros, bancos, depósitos y servicios de transfusión de sangre, deben mantener programas de gestión y control de calidad interna y externa así como cumplir con las normas y disposiciones que para el efecto dicte la autoridad sanitaria nacional”. El Ministerio de Salud Pública (MSP) establece el Programa de Evaluación

Externa del Desempeño (PEED) como mecanismo de control en los Servicios de Sangre del país, el cual está a cargo del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIEI) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) (PEED, 2011). Su objetivo fundamental es mantener un sistema seguro para donantes y transfusiones de sangre en el Ecuador, que intenta evaluar y monitorear de forma independiente la presentación de los exámenes serológicos que pertenecen al Sistema Nacional de Bancos de Sangre del Ecuador, por medio de la identificación de procesos de rastreo e implementación de acciones correctivas (Grijalva *et al.*, 2005b).

Las cargas social y económica asociadas pueden cuantificarse en términos de (i) pérdidas económicas (gastos médicos y pérdidas de productividad), que probablemente alcanzan los 23 millones de dólares al año, y (ii) pérdidas de años de vida por discapacidad (muertes prematuras y discapacidad asociada a las formas crónicas) (Abad-Franch y Aguilar, 2003).

3.3. INSECTOS TRANSMISORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.3.1. CLASIFICACIÓN Y SISTEMÁTICA

Los primeros relatos históricos sobre la existencia y hábitos de los triatominos en América fueron desde el siglo XVI (Neghme, 1982; Zeledón, 1983). De acuerdo a los aspectos históricos, la palabra “vinchuca”, es uno de los términos más usados en el cono sur para referirse a los triatominos, derivado del quechua “huinchuco”, lo que se creería que en épocas precolombinas éstos insectos ya eran conocidos (Neghme, 1982). Los triatominos poseen diversos nombres comunes o denominaciones populares dependiendo del país en el que se encuentren. En el idioma español, se los conoce como “chinchines” y “cacarachuelos” en México; “pitos” en Colombia; “chinchines mamones” y

“chinchas de monte” en Panamá; “pitos” y “chupos” en Venezuela; “hitas” en Bolivia, “barbeiros” en Brasil; “vinchucas” en Argentina, Chile, Uruguay, Bolivia y otras partes de Sudamérica, en Perú como: “chinchas”, “chinchones” y “chirimachas” (Moncayo, 1999) y en el Ecuador se lo denomina como “chinchorros”, “chinche caballo”, “guaro” en ciertas partes de la provincia de Loja, y “machaca” en otros lugares de la provincia de Manabí (Observaciones por parte del CIEI). En el idioma inglés se lo conoce como “conenose bug” or “kissing-bug” (Lent y Wygodzinsky, 1979; Galvão *et al.*, 2003).

Los vectores de *T. cruzi* son insectos del orden Hemiptera, suborden Heteróptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (Tartarotti *et al.*, 2006). Hasta la fecha la revisión de Lent y Wygodzinsky (1979) sigue siendo la más utilizada, apoyada con la de Carcavallo *et al.*, 1998a, para la clasificación taxonómica del grupo. Los insectos ubicados en el suborden Heteróptera (del griego heteros-diferente) presentan 73 familias, poseen alas anteriores, denominadas hemiélitros, con la mitad basal membranosa o más delgada que la otra mitad distal, la cual es más coriácea. Adicionalmente, poseen un rostrum o aparato succionador que sale desde la parte frontal de la cabeza (Borror *et al.*, 1989; Kendall, 2007).

Este aparato picador/succionador les permite alimentarse de diversos líquidos en la naturaleza, característica por las cuales se agrupa en (i) fitófagos, se alimentan de savia vegetal, (ii) entomófagos o predadores, succionan fluidos de otros artrópodos; y (iii) hematófagos, necesitan de la sangre de vertebrados para alimentarse, desarrollarse y reproducirse (Figura 3) (Borror *et al.*, 1989; Abad-Franch *et al.*, 2001a; Kendall, 2007).

La familia Reduviidae, consta de 31 subfamilias, entre las cuales tenemos a los Triatominae, que difieren entre ellas principalmente por un rostrum tri-segmentado que se fija sobre el surco estridulatorio en el proesterno (Lent y Wygodzinsky, 1979; Borror *et al.*, 1989). Adicionalmente, son considerados como hematófagos obligados (Galvão *et al.*, 2003). Sin embargo, es importante recalcar que los triatominos no son los únicos heterópteros de hábitos hematofágicos, sino que también existen integrantes de las familias Cimidae “chinchas de cama” (*Cimex sp.*) y Polycetenidae (ectoparásitos de murciélagos) (Galvão *et al.*, 2003; Coura, 2008).

Los Triatominos como subfamilia de los Reduviidae, se clasifican en 6 tribus y 18 géneros: (i) Alberproseniini - *Alberprosenia*, (ii) Bolboderini - *Bolboder*, *Belminus*, *Microtriatoma*, *Parabelminus*, (iii) Linshcosteusini - *Linshcosteus*, (iv) Cavernicolini- *Cavernicola*, (v) Rhodniini- *Rhodnius*, *Psammolestes* y (vi) Triatomini - *Triatoma*, *Meccus*, *Hermanlentic*, *Eratyrus*, *Mepraia*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus*, *Nesotriatoma*, *Paratriatoma* (Lent y Wygodzinsky, 1979; Carcavallo *et al.*, 2000; Sandoval *et al.*, 2000; Galvão *et al.*, 2003; Forero *et al.*, 2004; Poinar, 2005; Galvão y Angulo, 2006). Schofield y Galvão (2009) reportan 140 especies, de las cuales alrededor de 109 son endémicas del Nuevo Mundo (Galvão *et al.*, 2003; Forero *et al.*, 2004; Poinar, 2005; Galvão y Angulo, 2006). Sin embargo, para llegar a esta clasificación, básicamente se han basado en características morfológicas, como también en comparación de caracteres citogenéticos y moleculares, donde se han presentado algunos problemas para llegar a una clasificación unificada y estable (Schofield y Galvão, 2009).

La distribución geográfica de los triatominos a nivel mundial se extiende entre los paralelos 55 Norte y 55 Sur. En el Continente Americano esta subfamilia se distribuye

entre los paralelos 46 Norte y 46 Sur. La especie *Triatoma rubrofasciata*, que se ha registrado en el este de Asia (desde China hasta el norte de Australia) es de ubicación cosmopolita-tropical, la cual se cree que fue dispersada mediante barcos alrededor del mundo, considerada por lo tanto, como el ancestro de las especies asiáticas (Schofield, 2000b; Tartarotti *et al.*, 2006; Schofield y Galvão, 2009). Adicionalmente, especies del género atípico, *Linshcosteus*, con seis especies descritas, son conocidas en el subcontinente Indio (Tartarotti *et al.*, 2006). Estudios moleculares muestra que *Linshcosteus* y *T. rubrofasciata* son grupos hermanos y forma un solo clado (Hypša *et al.*, 2002; Schofield y Galvão, 2009), a partir de un ancestro común, que se supone fueron Reduvidaeos predadores que se adaptaron a la hematofagia (Gaunt y Miles, 2000; Tartarotti *et al.*, 2006). Una de las grandes interrogantes que aún genera discusiones y controversias entre los científicos, es conocer si esta subfamilia es de origen monofilético o polifilético (Galvao *et al.*, 2003; Tartarotti *et al.*, 2006).

Los géneros *Triatoma* y *Panstrongylus* (tribu Triatomini) están cercanamente asociados y se encuentran filogenéticamente distantes del género *Rhodnius* (tribu Rhodniini) (Gaunt y Miles, 2000). *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* son los principales géneros transmisores de la ECh en Latinoamérica (Figura 4) (CDC, 2011).

Dentro de la tribu Triatomini y Rhodniini se encuentran los principales géneros y especies de importancia en salud pública (Marquardt *et al.*, 2005), estas dos tribus (Triatomini y Rhodniini) poseen caracteres convergentes, que parecería que se encuentran asociados dependiendo del tipo de alimentación; sin embargo, tienen diferencias en patrones sensoriales (Catalá y Schofield, 1994; Schofield, 1994; Catalá, 1997) y en la fisiología de sus glándulas salivales (Ribeiro *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2000). De acuerdo,

a comparaciones morfométricas (alas y cabezas), junto con análisis moleculares (García *et al.*, 1998; Lyman *et al.*, 1999) sustentan la idea del origen polifilético y se pensaría que estas dos tribus se originaron probablemente de formas predadoras diferentes (Schofield, 2000b).

3.3.2. CICLO DE VIDA DE LOS TRIATOMINOS

Los triatomos son hemimetábolos (presentan una metamorfosis sencilla, sus larvas presentan una morfología similar a los adultos). De huevo pasan por cinco estadios ninfales, larvas sin alas y un estadio imaginal; adultos alados, sexualmente maduros, con los genitales completamente desarrollados. Para completar su ciclo biológico, requieren un tiempo aproximado de 3 meses a 2 años dependiendo de la especie, y de las condiciones ambientales (Cáceres, 2005; Marquardt *et al.*, 2005; Villacís *et al.*, 2008). La obtención de sangre en los triatomos es indispensable para la muda y la continuación de su desarrollo (Abad-Franch *et al.*, 2001a; Cáceres, 2005; Villacís *et al.*, 2008). Los huevos son colocados entre 10 y 15 días después de la cópula (Villacís *et al.*, 2008). Algunas hembras no apareadas pueden poner algunos huevos, pero éstos serán infértiles (Cáceres, 2005). El número de huevos puestos por hembra y la frecuencia de la oviposura depende principalmente de la cantidad de sangre ingerida (Friend *et al.*, 1965; Patterson, 1979), como también de la especie (Marquardt *et al.*, 2005). Una hembra puede producir hasta 1.000 huevos durante su vida, pero el promedio es de 200-300 cada año, sin embargo, algunas especies pueden poner entre 100 y 600 huevos a lo largo su vida reproductiva, los cuales pueden colocarlos individualmente o en grupo, ya sea en la tierra, madera, o en diferentes lugares donde puedan adherirse (Abad-Franch *et al.*, 2001b; Cáceres, 2005; Weiss *et al.*, 2011). Los huevos son de forma oval, más o menos elípticos, presentan un

opérculo en uno de sus extremos, por el cual emerge la ninfa I. A la puesta, los huevos son de color blanco-perla o gris, posteriormente cambian a rosado o rojizo a medida que el embrión se desarrolla (Schofield, 1994; Cáceres, 2005; Marquardt *et al.*, 2005; Villacís *et al.*, 2008). El tiempo que transcurre desde la puesta de los huevos hasta que eclosiona la ninfa I varía dependiendo de la especie (Cáceres, 2005; Villacís *et al.*, 2008). Transcurridos de dos a tres días después de emerger, las ninfas ya están listas para alimentarse; de no conseguir alimento, pueden pasar varias semanas en ayunas (Friend *et al.*, 1965; Patterson, 1979; Cáceres, 2005). Si las condiciones de alimentación son buenas, las ninfas pueden ingerir sangre hasta nueve veces su peso, mientras que los adultos, aproximadamente, de 2 a 4 veces (Cáceres, 2005; Villacís *et al.*, 2008).

3.3.3. HÁBITATS DE LOS TRIATOMINOS

Los triatominos se pueden encontrar en tres hábitats que son: el silvestre, peridomicilar y domiciliar. El hábitat silvestre, abarca algunos microhábitats como palmeras, árboles huecos, rocas, nidos de vertebrados; cuevas habitadas por murciélagos, madrigueras de mamíferos, lugares propicios dónde algunos mamíferos oportunistas, como roedores y marsupiales son considerados como fuente y alimento estable de alimento para los triatominos.

Definir el hábitat peridomiciliar ha sido una tarea difícil. Gürtler, (1999) define al peridomicilio como el área alrededor de los dormitorios donde se realiza la actividad humana cotidiana y se alojan los animales domésticos, pudiendo abarcar un radio de hasta 150 m alrededor de los domicilios; este hábitat es el lugar que probablemente brinda una mayor cantidad de refugios, por la amplia superficie que comprende. En este ambiente

encontramos, acumulaciones de objetos como leña, ladrillos, tejas y productos agrícolas (Zeledón *et al.*, 1977; Abad-Franch *et al.*, 2001a; Villacís *et al.*, 2010).

En el hábitat domiciliar, se pueden encontrar en las grietas de las paredes, debajo de la cama, detrás de cuadros, en acumulaciones de objetos como cartones con ropa, y nidos de gallinas o cuyeras, si éstas se encuentran dentro de la vivienda (WHO, 2002; Grijalva *et al.*, 2011).

3.3.4. DISTRIBUCIÓN DE POBLACIONES DE TRIATOMINOS EN EL ECUADOR

La presencia de al menos 16 especies de triatomos ha sido reportada en el Ecuador (Abad-Franch *et al.*, 2001b; Grijalva *et al.*, 2005a; Grijalva *et al.*, 2010; Villacís *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2011). De estas 16 especies, siete parecerían estar involucradas en la transmisión de *T. cruzi* a personas en diferentes partes del país: Las dos especies vectoras más importantes del país son: *Triatoma dimidiata* (Guayas, Manabí, Los Ríos, El Oro y Santo Domingo de los Tsáchilas; Napo y Sucumbíos deben ser confirmadas) (Aguilar *et al.*, 1999) y *Rhodnius ecuadoriensis* (Guayas, Manabí, Los Ríos, El Oro, Loja y Santo Domingo de los Tsáchilas); *Triatoma carrioni* en Loja (Grijalva *et al.*, 2005a; Grijalva *et al.*, 2010; Villacís *et al.*, 2010); *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus* y *Panstrongylus geniculatus* en la cuenca Amazónica (Aguilar *et al.*, 1999; Abad-Franch *et al.*, 2001b). *Panstrongylus rufotuberculatus* y *P. chinai* en zonas más restringidas (Abad-Franch *et al.*, 2001b) como Loja (Grijalva *et al.*, 2005) y *P. howardi*, especie endémica de la provincia de Manabí, de importancia epidemiológica (Grijalva *et al.*, 2011) por tener un índice de infección de ~ 78,6 % (Grijalva *et al.*, 2011). Otras especies que muy poco se

conoce sobre su comportamiento e importancia epidemiológica son *P. herreri*, *Eratyrus mucronatus*, *E. cuspidatus*, *Cavernicola pilosa*, *Triatoma venosa* y *T. dispar* (Aguilar *et al.*, 1999; Abad-Franch *et al.*, 2001b).

En cuanto a su distribución general en el Ecuador, los triatominos se localizan en zonas de vida que se encuentran entre el nivel del mar hasta los 2.650 msnm en Loja, que corresponde a un registro de *Triatoma carrioni* (Lent y Wygodzinsky, 1979; Abad-Franch *et al.*, 2001b, Grijalva *et al.*, datos no publicados). Adicionalmente, ocupan áreas con un amplio rango climático, incluyendo zonas con pluviosidad anual desde 62.5-125 mm/año en zonas de desierto tropical hasta 2 000-4 000 mm/año en zonas de bosque lluvioso, y temperaturas medias anuales desde 12-18 °C en el bosque montano bajo hasta 24-26 °C en zonas costeras de bosques secos tropicales (Abad-Franch *et al.*, 2001a).

3.4. *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent y León, 1958)

3.4.1. GENERALIDADES Y DISTRIBUCIÓN

Rhodnius ecuadoriensis es considerado como un derivado evolutivo de *R. pallescens*, representado por una serie de poblaciones en el límite sur de un gradiente de especies norte-sur (López y Moreno, 1995). Estas dos especies, junto a *R. colombiensis*, conforman el grupo “pallescens” de la cordillera de los Andes, en el noroeste de América del Sur (Schofield y Dujardin 1999). Las tres especies son casi exclusivamente arbóreas y colonizan las palmeras (Barrett, 1991), por ejemplo, *R. colombiensis* está asociada a las palmas de vino (*Attalea butyraceae*), en la región central de Colombia (Moreno *et al.*, 1999). *R. pallescens*, también se encuentra asociado a palmeras del género *Attalea* pero en

un área geográfica mayor (Pizarro y Romaña, 1998). Hasta ahora las especies del grupo *pallenscens* son consideradas de importancia secundaria como vectores de la ECh, debido a que muestran baja capacidad para colonizar viviendas, donde los adultos vuelan frecuentemente a las viviendas, y pueden transmitir la enfermedad a animales domésticos y seres humanos, como es el caso de *R. pallenscens* en Panamá. Sin embargo, *R. ecuadoriensis* se encuentra ampliamente distribuida en el centro y el sur del Ecuador como también en el norte del Perú, aunque en este último su distribución es netamente domiciliar (Abad-Franch *et al.*, 2001b, Cuba-Cuba *et al.*, 2002, Grijalva *et al.*, 2005a). Existe la hipótesis que poblaciones domiciliarias del norte del Perú han sido importadas desde el sur del Ecuador (Schofield y Dujardin, 1997), pero no hay suficiente estudios para asegurar esta hipótesis.

Esta especie se la ha considerado como el segundo vector de ECh en el Ecuador. La presencia de *R. ecuadoriensis* se ha registrado en más de 110 localidades del país, correspondientes a seis provincias (Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí, Guayas, Los Ríos, El Oro y Loja) de las veinte y cuatro, y es considerado como vector primario en los valles interandinos de Loja y el Oro. Ésta especie puede ocupar zonas entre 0 y 900 m de altitud (>2000 msnm), donde la pluviosidad anual es de 125-4000 mm y temperaturas promedio que oscilan entre 18°C y 26°C (Abad-Franch *et al.*, 2001a; Abad-Franch, 2002; Cuba-Cuba *et al.*, 2002; Villacís *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, datos no publicados).

3.4.2. HÁBITATS DE *Rhodnius ecuadoriensis*

Rhodnius ecuadoriensis, es una especie que se encuentra en los tres hábitats (domiciliar, peridomiciliar y silvestre) (Grijalva *et al.*, 2010; Villacís *et al.*, 2010); en el

ambiente silvestre se encuentra relacionado con palmeras del género *Phytelephas aequatorialis*, las cuales se consideraba como el primer ecotopo de este triatomino (Aguilar *et al.*, 1999, Abad-Franch *et al.*, 2001a, Abad-Franch *et al.*, 2005b, Cuba-Cuba *et al.*, 2002). *P. aequatorialis* tiene una gran importancia económica en el oeste del Ecuador, ya que se utilizan sus frutos para la manufacturación de artesanías y las hojas para la construcción de techos en las viviendas (Henderson *et al.*, 1995, Southgate, 1997, Abad-Franch *et al.*, 2005). A esta palma se la conoce como “palma de tagua o cade”, y son abundantes en el bosque húmedo de las provincias de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas, en el centro-oeste de Ecuador. Su presencia va disminuyendo hacia el sur, siendo menos frecuente en la provincia del Oro y ausente en los valles interandinos de la provincia de Loja (Cuba-Cuba *et al.*, 2002), donde la vegetación cambia a bosque seco. Sin embargo, estudios han demostrado que *R. ecuadoriensis* en la provincia de Loja y Manabí se encuentra asociada a nidos de ardillas (*Sciurus stramineus*) (Grijalva y Villacís, 2009; Suarez-Davalos *et al.*, 2010; Villacís *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, datos no publicados), y en la provincia de Guayas asociado con el ave, *Campylorhynchus fasciatus* (Troglodytidae) (Grijalva *et al.*, 2010); y en la provincia de los Ríos, a esta especie se le ha encontrado asociado con *Elaeis guineensis* o palma africana de aceite (Cuba-Cuba *et al.*, 2002), la cual es cultivada principalmente en la parte costera como también en la región Amazónica del Ecuador.

Rhodnius ecuadoriensis, se encuentra en los hábitats domiciliar principalmente en las tablas de las camas, detrás de cuadros, en grietas en las paredes de adobe o bareque, además se puede encontrar en cuyeras o nidos de gallina si éstas se encuentran dentro de la vivienda (Villacís *et al.*, 2010). En el ambiente peridomiciliar, esta especie se encuentra, especialmente en nidos de gallina (construidos con hojas de plátano), cuyeras, y en

acumulaciones de madera y leña, lugar propicio para que puedan anidar los roedores y otro mamíferos oportunistas (Villacís *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, datos no publicados).

3.4.3. MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE *Rhodnius ecuadoriensis*

Rhodnius ecuadoriensis es un triatomino pequeño, de color marrón claro arenoso, con marcas o manchas irregulares distribuidas por diferentes zonas del cuerpo. La cabeza es corta y ancha de aspecto rugoso en comparación con otras especies del mismo género, sus ojos son pequeños. El cuello es claro en su parte basal y oscuro en los laterales. El escutelo es de color claro (Lent y León, 1958). Los hemiélitros son de color arenoso, incluyendo la venación; los espacios entre las venas muestran bandas y manchas oscuras irregulares. Sus patas son de color marrón claro amarillento o arenoso, con un patrón de manchas irregulares más oscuras especialmente conspicuo en los fémures (Lent y León, 1958), esta característica comparte con otras especies del mismo género, como *R. pallescens* (Abad-Franch, 2002). En cuanto a su tamaño, la longitud total de los adultos, los machos miden 12,5 – 13,5 mm, mientras que las hembras son de 14,5 mm (Lent y León, 1958). Sin embargo, estudios realizado por Villacís *et al.*, 2008, al comparar poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Loja y Manabí, encontró diferencias entre los machos y hembras de *R. ecuadoriensis* $13,82 \pm 0,36$ mm, y $16,59 \pm 0,32$ mm de respectivamente en Manabí; mientras que en Loja los machos presentaron un tamaño de $12,53 \pm 0,33$ mm, y las hembras $14,72 \pm 0,39$ mm (Figura 5), se pensó que estas diferencias podrían deberse a consecuencia de la adaptación a factores como el clima, el ciclo de vida, disponibilidad de alimento (sangre), esta situación es diferente en hábitats silvestre (Zarate, 1983; Schofield, 1985; Cabello *et al.*, 1987, Guarneri *et al.*, 2000a,b; Martinez-Ibarra *et al.*, 2003, Arévalo *et al.*, 2007; Villacís *et al.*, 2008).

Según Villacís *et al.*, 2008, el ciclo de vida de *R. ecuadoriensis* se cumple en aproximadamente seis meses desde que son huevos hasta adultos, se demoran 15 días hasta el momento en que eclosiona la ninfal I (NI). Para completar todo el ciclo, necesitan por lo menos ingerir una cantidad representativa de sangre durante cada estadio ninfal hasta llegar a ser adulto y completar su ciclo. Los especímenes de *R. ecuadoriensis* de Manabí presentaron un mayor tamaño de ingesta que los de Loja, registrando una correlación con el tamaño del cuerpo, siendo más grande los individuos de Manabí que los de Loja, tanto en hembras como machos (Figura 5).

El estudio de los hábitos de alimentación y defecación tanto en los adultos como en las ninfas de *R. ecuadoriensis* demostraron que defecan durante o inmediatamente después de la alimentación (post-prandial). Más aún, las hembras adultas parecen tener una mayor capacidad vectorial que los otros estadios, lo que ha sido reportado en algunas especies de triatomíneos como también en *R. ecuadoriensis* (Rabinovich *et al.*, 1979; Crocco y Catalá 1996; Noguera-Torres *et al.*, 2000; Nattero *et al.*, 2002).

3.5. GENOTIPO Y FENOTIPO

El fenotipo es la expresión del genotipo en un determinado ambiente. Los rasgos fenotípicos incluyen rasgos tanto físicos como conductuales. Cada individuo es un ser único que expresa en sus formas, colores, proporciones y tamaño, donde se entrelazan los genes y el ambiente (Catalá y Dujardin, 2007a). Mientras que el genotipo se lo define como el conjunto de genes o información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN (Hartl, 2000).

3.5.1. PATRONES MORFOLÓGICOS - FENOTIPO

La morfología es una disciplina que estudia el fenotipo en todos sus aspectos, ésta permite interpretar relaciones funcionales y adaptaciones al hábitat por parte de las distintas especies de triatomíneos (Catalá y Dujardin, 2007a). La expresión genética interactúa con la variabilidad ambiental para dar origen a la diversidad fenotípica. El individuo adulto es el resultado de tal interacción que se presenta a lo largo de su desarrollo (Jaramillo, 1999).

La morfología cuantitativa, permite expresar numéricamente la diversidad biológica, que es el resultado de la interacción del genotipo con el medio ambiente, ya sea, a nivel eco-geográfico, adaptación al hábitat y/o preferencia a un hospedero (Dujardin *et al.*, 2009). Existen algunas técnicas que permiten cuantificar la variación morfológica, pero las más utilizadas son los fenotipos antenales y la morfometría geométrica.

Según Catalá y Dujardin (2007a), existen algunas causas de variación morfológica, como por ejemplo (i) fisiológicas, el crecimiento de un organismo, en el que se cambia las dimensiones anatómicas de un determinado órgano o unidad funcional, afectando el producto final (geometría), (ii) patológicas, que afectan o producen inestabilidad en el crecimiento o desarrollo de un organismo, modificando la morfología del espécimen; éstas pueden ser inducidas por mutación, o por intoxicación (insecticidas), siendo detectable al examinar la simetría del individuo; (iii) genéticas, el crecimiento del organismo se produce principalmente durante la morfogénesis, y el control genético regula la secuencia que influye en el crecimiento y desarrollo de cada órgano.

Es importante también conocer que la estructura poblacional y, en especial, el aislamiento poblacional puede generar variaciones morfológicas intra-específicas debidas a la deriva genética. Este es un mecanismo frecuente de variación genética entre poblaciones de una misma especie, que no es precisamente por mutación genética, sino por un cambio en la frecuencia de los genes. En la medida en que la estructuración poblacional tenga un papel en la formación de las especies, tales cambios morfológicos se pueden llamar variaciones micro-evolutivas (Catalá y Dujardin, 2007a). Las causas adaptativas se refieren a la selección de genotipos adaptados a un ambiente externo particular. Típicamente, son modificaciones asociadas a las regiones geográficas diferentes, y en ecotopos diferentes. Las variaciones climáticas o ecológicas no seleccionan directamente a los genotipos, pero seleccionan a los fenotipos. Los fenotipos "óptimos" sobreviven y se reproducen (Dujardin *et al.*, 2009).

3.5.1.1. SISTEMA SENSORIAL DE LOS INSECTOS: FENOTIPO ANTENAL

El sistema sensorial de los insectos, ha evolucionado con numerosas especializaciones que les han permitido detectar y monitorear ciertas características del medio que les rodea. El inmenso número de especies de insectos y la variedad de hábitats en los que ellos puede vivir y adaptarse adecuadamente, ha despertado el interés de conocer más sobre este sistema, que les permite responder ante las presiones selectivas de manera eficiente y sobrevivir ante adversidades.

La antena es un órgano imprescindible para el triatomino (Catalá y Schofield 1994; Catalá 1997), y constituye el mayor sistema sensorial (sensores de ambiente) (Dujardin *et*

al., 2009). El sensillum (plural sensilla) es la unidad estructural en la que derivan la mayoría de los órganos sensoriales de insectos. Ésta consiste básicamente de una estructura cuticular en forma de cerda o pelo, esta estructura está formada de una o más neuronas sensitivas y una o más células acompañantes que reciben estímulos que alcanzan los nervios y desde allí al cerebro. Estos sensilla reciben estímulos: (i) mecánicos (bristles – BR), (ii) químicos (basicónicos - BA, y las sensillas tricoideas: tricoides de pared fina - TPF y tricoides de pared gruesa - TPG); (iii) higrotérmicos (coeloconicos), (iv) receptores infrarojos (cave organ) y (v) los propioceptores (campaniformes). Los tres últimos son poco conocidos para estudios de triatominos (Catalá y Schofield, 1994; Catalá, 1998; Lorenzo-Figueiras y Lazzari, 1998; Lorenzo *et al.*, 1999).

Estos receptores sensoriales están localizados especialmente en antenas, piezas bucales, genitalia y patas pero también es posible hallarlos en otras partes del cuerpo (Catalá y Schofield, 1994). Mediante estos receptores pueden captar olores del hábitat, a los demás miembros de la población (ferormonas) y buscar hospederos para el proceso de alimentación (Schofield, 1994). Estudios realizados con otras especies, indicaron, que la temperatura y algunos estímulos químicos como: CO₂, amoníaco, ácido láctico, pirúvico y butírico son atrayentes para que sean percibidos por los triatominos (Lorenzo Figueiras y Lazzari, 1998; Lorenzo *et al.*, 1999). Adicionalmente, mediante receptores se pueden percibir sonidos, corrientes de aire y movimientos en general y calor (Lorenzo Figueiras y Lazzari, 1998; Lorenzo *et al.*, 1999).

El número de sensilla de cada tipo y su distribución sobre un órgano constituyen el patrón de sensilla o fenotipo antenal. El fenotipo antenal parecería que está estrechamente vinculado a las necesidades específicas en una etapa del ciclo vital, sexo, especie o

población. Los estudios de fenotipo antenal (tipo y número de sensilla presentes en las antenas) han sido muy útiles para diferenciar géneros, especies y sexo en los triatomíneos, actualmente se está utilizando en la comparación de la adaptación de las poblaciones de una misma especie a diferentes hábitats, y distribución geográfica (Catalá y Schofield 1994; Catalá, 1997; Gracco y Catalá 2000; Carbajal de la Fuente y Catalá 2002; Moreno *et al.*, 2005; Catalá y Dujardin 2007b; Carbajal de la Fuente *et al.*, 2008). Los tipos de receptores presentes en cada segmento de la antena están definidos genéticamente para cada especie, no obstante, el fenotipo antenal pueden estar influenciado por las condiciones ambientales (Catalá y Dujardin, 2001; Carbajal de la Fuente y Catalá, 2002; Villela *et al.*, 2005; Arroyo *et al.*, 2006; Esteban *et al.*, 2006). Cada muda que sufre un triatómino en su desarrollo significa un cambio de la estructura de la antena. Al formarse una nueva cutícula en cada estadio, aumenta el número de sensilla antenales, de ésta manera, se facilitan las necesidades sensoriales del insecto. Las mayores modificaciones del fenotipo antenal ocurren en la última muda (Gracco y Catalá 2000). Durante la vida ninfal de los triatóminos, las actividades que desempeñan son básicamente la búsqueda de alimento y refugio (Catalá y Schofield, 1994), mientras que los adultos incorporan otra actividad además de las antes mencionadas, que es la necesidad de encontrar un compañero sexual; en el caso de las hembras, buscan un lugar adecuado para la ovoposición y la capacidad de dispersarse mediante el vuelo a la búsqueda de nuevos hábitats y hospederos (McIver, 1987; Catalá y Schofield, 1994). Sin embargo, para la realización de todas estas actividades necesitan energía, y esa energía es adquirida por medio del alimento (sangre).

3.5.1.2. MORFOMETRÍA

La morfometría es la descripción cuantitativa, análisis e interpretación de la forma y la variación de la misma en Biología (Rohlf, 1990). Tradicionalmente las variables usadas en los análisis morfométricos son las coordenadas de los puntos o distancias entre puntos, al seleccionar las variables reducimos el volumen de datos, sin perder la habilidad de representar la forma de las estructuras de una manera adecuada (Rohlf, 1990). Se pueden encontrar dos tipos de Morfometría, (i) la Tradicional (MT) y (ii) la Geométrica (MG). La MG es una técnica que preserva la información de la geometría del organismo, mientras que la MT es una aplicación de métodos estadísticos multivariados a colecciones arbitrarias de variables de tamaño o conformación (Jaramillo, 1999).

La Morfometría proporciona un conjunto de técnicas analíticas para cuantificar la variación morfométrica y de esta manera, dividir los componentes ya sea el genético o el ambiental de los rasgos examinados, es decir, estudiar por separado la conformación y el tamaño, relacionando con el entorno interno y externo de las poblaciones, asumiendo que ambos pueden ser modificados por razones biológicas diferentes (Jaramillo *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002). El componente (conformación) presenta mayor estabilidad y se supone que su análisis informa sobre la variación genética (Jolicoeur, 1963; Pimentel, 1992); mientras que el componente (tamaño) es más sensible a variaciones ambientales (Dujardin y Le Pont, 2000). En los análisis morfométricos es importante contestarnos si los cambios morfométricos que se observan en las poblaciones son de naturaleza genética o ambiental. Sin embargo, la información que se pueda extraer de la variación morfométrica ayuda a responder de manera preliminar a la pregunta de las causas de la variación, no

obstante, se necesita complementar y comparar con estudios moleculares (Dujardin y Le Pont, 2000).

De acuerdo a Dujardin (2000), se pueden definir matemáticamente dos tipos de crecimiento (i) la alometría, la cual es cualquier cambio de conformación con el tamaño, es decir, cambios de forma en función del tamaño. Este tipo de crecimiento es de comportamiento común en la naturaleza y se da cuando la velocidad de crecimiento de una parte del organismo es diferente a la de otra parte o a la del cuerpo como un todo (Jaramillo, 1999). Jarrín (2005), describe el efecto alométrico como la “variación intraespecífica, no geográfica”, y reconoce que el ambiente puede afectar más fácilmente el tamaño que la estructura en las formas biológicas. Los efectos de la presión selectiva impuesta por el ambiente como: requerimientos fisiológicos, interacciones competitivas, dimensionalidad del nicho ecológico, estatus social, competitividad reproductiva, entre otros factores, influyen en la dinámica evolutiva de poblaciones y especies, e interactúan en forma compleja y poco comprendida con la variabilidad en tamaño, ya sea de forma directa o indirecta a través de correlaciones con la estructura biológica. La variabilidad de tamaño y la interacción con las estructuras biológicas, generan variación que puede dar a lugar a procesos de especiación y adaptación evolutiva. (ii) El crecimiento isométrico se presenta cuando la velocidad de crecimiento es la misma que la del crecimiento global. Este tipo de crecimiento es una excepción en la naturaleza (Jaramillo y Dujardin, 2002). La causa más frecuente de diferencias de tamaño entre individuos de la misma especie es fisiológica, es decir, el crecimiento desigual. Pero las diferencias de tamaño resultan tanto de causas ambientales como genéticas: la divergencia causada por el aislamiento geográfico (diferenciación geográfica) y la selección natural de genotipos que expresan un

fenotipo de tamaño ligado a caracteres con mayor eficacia biológica (“fitness”) (Dujardin, 2000).

3.5.1.2.1. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA (MG) DE HEMIÉLITRO

En 1993 se creó el acceso a nuevas herramientas conocidas como “morfometría geométrica” (MG), que es una técnica novedosa, en la cual se utiliza como información principal la posición relativa de puntos anatómicos de referencia que son homólogos de un individuo al otro (Rohlf y Marcus, 1993).

La morfometría se usa en estudios taxonómicos, genéticos y ecológicos, ha sido utilizada en muchos campos como: citología, antropología, geología, paleobiología, nematología y entomología (Rohlf, 1990). Actualmente, la morfometría se ha utilizado como un marcador fenético en los triatominos, aplicándose a diferentes campos tales como filogenética, diferenciación de ecotopos, diferenciación geográfica, entre otros (Casini *et al.*, 1995; Schofield *et al.*, 1996; Dujardin *et al.*, 1999; Monroy *et al.*, 2003; Bustamante *et al.*, 2004). De igual manera, se ha utilizado para estudios en taxonomía y sistemática filogenética (Dujardin *et al.*, 1999; Gumiel *et al.*, 2003), diversidad biológica (Adams *et al.*, 2004), biología evolutiva (Footit and Sorensen, 1992) y diferenciación sexual en las distintas especies de triatominos (Matias *et al.*, 2001, Villegas *et al.*, 2002).

La MG además ha permitido estimar la estructuración espacial como también caracterizar las poblaciones en distintos hábitats (Gumiel *et al.*, 2003; Schachter-Broide *et al.*, 2004; Feliciangeli *et al.*, 2007), esto ha sido probado para los principales transmisores de la ECh como *Triatoma infestans* (Catalá y Dujardin 2001; Hernández *et al.*, 2008;

Abrahan *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2011), *Triatoma dimidiata* (Catalá *et al.*, 2005, Arroyo *et al.*, 2006), *Panstrongylus megistus* (Villela *et al.*, 2005) y *Rhodnius prolixus* (Esteban *et al.*, 2006).

3.5.2. PLASTICIDAD FENOTÍPICA (PF)

Para los estudios de la variación intraespecífica, es importante entender la definición de plasticidad fenotípica (PF), la cual es la habilidad de un genotipo para producir más de una alternativa en la morfología, estado fisiológico y/o comportamiento en respuesta a las condiciones ambientales. La PF juega un papel determinante en los procesos de especiación dentro de los cambios morfológicos dentro de una misma especie (West-Eberhard, 1989). Sin embargo, la PF no ha sido considerada como un factor importante en la evolución ya que evolución en general se define como un cambio en las frecuencias génicas, por lo que las variaciones asociadas con las condiciones ambientales no se consideran evolución, no obstante, el ambiente no es un agente de selección es un agente de desarrollo, el cual influencia el rango de fenotipos que serán producidos por un genotipo (Dujardin, 2000). Los cambios fenotípicos son los primeros que ocurren en el proceso de la llegada de una población a un nuevo hábitat o nicho (West-Eberhard 1989). Las poblaciones y las especies se pueden solapar cuando los caracteres son estudiados individualmente, pero pueden convertirse en identidades distintas cuando muchos caracteres juntos son considerados (Footit y Sorensen, 1992).

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de información que pueden proporcionar los marcadores fenéticos, estos deben estar apoyados con estudios de marcadores moleculares, que permitan conocer la variación genética de una especie en particular. La

aplicación de técnicas moleculares han sido utilizadas para conocer las causas y consecuencias de cambios históricos en las poblaciones naturales, como también la cantidad y distribución de la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones (flujo génico) (Troya, 2006).

3.5.3. CRUCES EXPERIMENTALES - PRIMERA GENERACIÓN (F1)

En los últimos años se han aplicado diversidad de técnicas moleculares y morfométricas con el fin de llevar a cabo la identificación de especies. Recientemente se ha sugerido el uso de herramientas complementarias a estas técnicas para el estudio de la sistemática de insectos en general y de los triatominos en particular (Dujardin, 2006). Los cruzamientos experimentales de diferentes poblaciones o especies son una de ellas.

Los genes de cada población se integran en complejos coadaptados y su ruptura puede modificar patrones de conducta simple y compleja (Godoy-Herrera, 2001). Cuando los seres vivos se reproducen sexualmente, sus descendientes desarrollan rasgos diferentes, que son heredados de cada uno de sus padres. Existen algunas teorías que han sido formuladas para explicar cómo se heredan las características (Hartl, 2000). Las leyes de Mendel explican y predicen cómo van a ser las características de un nuevo individuo, partiendo de los rasgos presentes en sus padres y abuelos. Las características se heredan de padres a hijos, pero no siempre de forma directa, puesto que pueden ser dominantes o recesivos. Los caracteres dominantes se manifiestan siempre en todas las generaciones, pero los caracteres recesivos pueden permanecer latentes, sin desaparecer, para manifestarse en generaciones posteriores (Hartl, 2000).

Los principios establecidos por Mendel (1822-1884) fueron los siguientes:

- (i) **Primera ley de Mendel o ley de la uniformidad.** Establece que si se cruzan dos razas puras para un determinado carácter, los descendientes de la primera generación son todos iguales entre sí (igual fenotipo e igual genotipo), e iguales (en fenotipo) a uno de los progenitores.
- (ii) **Segunda ley de Mendel o ley de la segregación.** Establece que los caracteres recesivos, al cruzar dos razas puras, quedan ocultos en la primera generación (F1) y reaparecen en la segunda (F2), en proporción de uno a tres respecto a los caracteres dominantes. Los individuos de la F2 que resultan de los híbridos de la F1 son diferentes fenotípicamente unos de otros; esta variación se explica por la segregación de los alelos responsables de estos caracteres, que en un primer momento se encuentran juntos en el híbrido y que luego se separan entre los distintos gametos.
- (iii) **Tercera ley de Mendel o ley de la independencia de caracteres.** Establece que los caracteres son independientes y se combinan al azar. En la transmisión de dos o más caracteres, cada par de alelos que controla un carácter se transmite de manera independiente de cualquier otro par de alelos que controlen otro carácter en la segunda generación, combinándose de todos los modos posibles.

El principal enfoque que se ha utilizado para los estudios de cruces experimentales es el de la hibridización entre especies; sin embargo, también se ha aplicado para estudios de poblaciones geográficas, que con anterioridad habían sido consideradas dentro de una

misma especie. Los estudios de hibridización en Triatominos permite la formulación de hipótesis concernientes al origen y divergencia de las especies como tal (Belisário *et al.*, 2007) o crípticas (Panzera *et al.*, 2006). Debido a la similitudes morfológicas, la mayoría de especies de Triatominos pueden ser agrupadas en complejos específicos (Carcavallo *et al.*, 2000), los cuales han sido muy discutidos en el contexto de re-evaluar la distinción de las especies y establecer términos precisos para su identificación (Belisário *et al.*, 2007). El aislamiento reproductivo es el mejor criterio para evaluar el estatus taxonómico de una determinada población (Costa *et al.*, 2003; De Souza *et al.*, 2008).

Los estudios utilizando cruces experimentales en insectos parten del concepto de especie propuesto por Dobzhansky (1937): “Una especie es un grupo de individuos completamente fértiles, pero reproductivamente aislados de otros grupos similares debido a sus características fisiológicas, produciendo incompatibilidad parental, híbridos estériles o ambos”. Muchas especies de Triatominos, morfológicamente similares o no, genéticamente cercanas o no, se conoce que producen híbridos bajo condiciones tanto naturales como experimentales (Noireau *et al.*, 1998; Belisário *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009).

Diferentes estudios sugieren que los factores ecológicos podían influenciar en el proceso de especiación en los Triatominos y que la diferenciación morfológica podría ser más rápida que la instalación de barreras reproductivas o genéticas (Usinger *et al.*, 1966; Pereira *et al.*, 1996; Dujardin *et al.*, 1999). Así, la especie morfológica sería una “especie ecológica”, una visión que se ajusta al concepto de “unidades evolutivas” en el que dos poblaciones se convierten en especies diferentes si siguen diferentes destinos evolutivos, aún cuando fuesen genéticamente muy próximas (Dujardin *et al.*, 1999).

El concepto de aislamiento reproductivo, como definición de especies debe ser interpretado no solo como la posibilidad biológica de tener descendencia fértil, sino a través de barreras geográficas o ecológicas que hacen que el apareamiento sea imposible entre poblaciones que no son genéticamente incompatibles (Carcavallo *et al.*, 2000). Los eventos de hibridización son usualmente consideradas como punto final de la evolución, ya que, frecuentemente resultan en progenie no viable o infértil; sin embargo, un enfoque alternativo, asume que la hibridización guía a la producción de nuevas combinaciones de genes, así como, a nuevos alelos, por medio de la creación de condiciones genéticas favorables para que ocurran cambios evolutivos rápidos y mayores (Pérez *et al.*, 2005). Sin embargo, en este estudio es importante conocer que es una población, la cual, se la considera como un conjunto de organismos de la misma especie que se cruzan entre sí y habitan en una área geográfica en particular en un tiempo determinado (Odum, 1986).

Se ha sugerido los estudios de cruces en *R. ecuadoriensis*, ya que pueden ser de mucha utilidad para dilucidar la importancia epidemiológica de las poblaciones, así como, para contribuir su correcta clasificación taxonómica, apoyando los resultados que se han obtenido con otras herramientas (fenotípicas y genotípicas).

3.5.4. MARCADORES MOLECULARES - GENOTIPO

La biología molecular es una herramienta que ha brindado nuevas posibilidades para dilucidar interrogantes en los campos de la historia natural, la Evolución y la Biología de la Conservación, aplicables a la preservación de los recursos genéticos y los procesos evolutivos (Avice, 1994; Abad-Franch y Monteiro, 2005).

Las técnicas moleculares ofrecen una visión complementaria a los estudios tradicionales (Avisé, 1994, 2000; Zhang *et al.*, 2001). El desarrollo de marcadores moleculares ha tenido un gran impacto en el estudio de la genética de animales y plantas (Saiki *et al.*, 1988), y se definen como fragmentos específicos del ácido desoxirribonucleico, ADN, que pueden ser identificados en todo el genoma. Se usan para “marcar” la posición de un gen en concreto o a la herencia de una característica en particular. Los primeros marcadores se desarrollaron a finales de los años 70, los que se basaron en la identificación de proteínas o isoenzimas (Bergmann, 1971; Bergmann *et al.*, 1989). El análisis del genoma y la creación de mapas genéticos de alta resolución se están desarrollando a gran velocidad gracias al uso de estos marcadores. A finales de los años 80 aparece la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual ha permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en ADN (Saiki *et al.*, 1985; Schlötterer, 2004).

La caracterización genética de las poblaciones naturales se realizó en primera instancia, a través del estudio de polimorfismos genéticos de isoenzimas, que permiten detectar una caída en la heterocigosis poblacional (Allendorf y Leary, 1986). Posteriormente, empezaron a utilizarse marcadores moleculares del ADN, tales como RFLP (Análisis de polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción) y RAPD (Análisis al azar de polimorfismos del ADN), huellas digitales del ADN y secuenciación del ADN mitocondrial (Soltis *et al.*, 1998). Dado que el polimorfismo es un fenómeno muy común en insectos y que muchas veces sólo puede ser detectado mediante electroforesis de alozimas o secuenciación de ADN mitocondrial, estas técnicas resultan fundamentales para el monitoreo de sus poblaciones (Samways, 1994). Los resultados obtenidos a partir de estas técnicas contribuyen a definir los límites de las poblaciones, estudiar su estructura,

revelar patrones de migración, estimar el flujo génico interpoblacional, detectar la posible declinación de las mismas, debido a diferentes factores de disturbio del ambiente (Avisé y Hamrick, 1996); conocer la estructura y heterogeneidad genética entre las diferentes especies y poblaciones de distinto origen geográfico (Avisé, 1994; Williams *et al.*, 1990; Moritz y Hillis, 1996), adicionalmente, también se utiliza en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, localización de resistencia y dispersión de especies (Avisé, 1994; Williams *et al.*, 1990; Troya, 2006).

Los marcadores genéticos más utilizados son los basados en clonación y secuenciación de fragmentos de ADN, mientras que otros, más aleatorios, se basan en la detección de polimorfismos al azar (fingerprint markers) (Dodgson *et al.*, 1997). Existen una serie de técnicas que han sido desarrolladas para estimar la diversidad genética, sin embargo, el utilizar una sola técnica no es lo ideal, ya que cada una manifiesta fortalezas como debilidades (Sunnucks, 2000; Troya, 2006). Esto es porque cada gen puede tener una historia evolutiva que no representa la del organismo en cuestión, puede sesgar resultados. Es por esto, que se estudian varios genes independientes, con el fin de combinar su poder resolutivo y discriminatorio para construir una historia evolutiva más confiable.

3.5.1. GENÉTICA DE POBLACIONES DE INSECTOS

Desde la primera mitad del siglo XX, la genética de poblaciones aportó las bases teóricas y metodológicas para cuantificar los cambios producidos en la estructura de las poblaciones naturales, por mutación, selección natural y/o deriva génica (Wright, 1978; Harlt, 2000). Las poblaciones de plantas, animales e insectos, son grupos de individuos de

la misma especie que viven en un ambiente en particular. Todas presentan variaciones en el fenotipo de los individuos, aunque algunas pueden presentar diferencias más marcadas que otras. La genética de poblaciones cuenta con diversas técnicas que permiten estudiar la estructura y la historia evolutiva de las poblaciones, mediante la obtención de datos que luego son analizados estadísticamente y/o filogenéticamente (Avice, 2000).

3.5.4.2. GEN MITOCONDRIAL – CITOCROMO B (mt Cyt b)

3.5.4.2.1. CARACTERÍSTICAS

El análisis de las secuencias de los genes mitocondriales se realiza examinando los haplotipos. Los haplotipos se definen como la combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma, que son transmitidos juntos. Un haplotipo puede ser un locus, varios loci, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci; o es un conjunto de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en un cromosoma particular que están estadísticamente asociados (Normark y Lanteri, 1998). El número de haplotipos presentes en una especie o población brinda una estimación de su diversidad genética y permite realizar inferencias sobre su historia evolutiva, la ventaja de estos genes es fácil secuenciar, y es de herencia uniparental (Gómez-Zurita *et al.*, 2000; Juan *et al.*, 2000). Los datos de secuencias pueden analizarse mediante algoritmos de simplicidad ("parsimony") o de máxima verosimilitud ("maximum likelihood"), a partir de los cuales se obtienen árboles filogenéticos (Soltis *et al.*, 1998). La tasa de mutación es elevada con respecto a la de otros genes (nucleares o ribosomales) y por lo tanto, es adecuada a niveles específico e infraespecífico; además resultados de estudios con mtADN, nos permite conocer la posibilidad de introgresión (Abad-Franch y Monteiro, 2005).

Las filogenias de los organismos proveen una descripción de la biodiversidad, dado que brindan información acerca de cómo se distribuye la diversidad genética (expresada en caracteres) entre los taxones estudiados (Moritz, 1994). Se pueden reconstruir filogenias de individuos de una población, con el objeto de obtener información sobre la dinámica histórica de dicha población, o filogenias de especies o poblaciones, que aportarán evidencias sobre cómo ocurrió la evolución de un grupo (Harvey y Steers, 1999). Dado que los caracteres morfológicos son en muchos casos insuficientes para delimitar especies, subespecies, linajes o biotipos, y para reconstruir su filogenia, la evidencia molecular resulta particularmente importante, pues permite ampliar el conocimiento sobre la diversidad genética del grupo (Silva *et al.*, 1999).

3.5.4.2.2. DIVERSIDAD GENÉTICA O VARIABILIDAD GENÉTICA

La variabilidad genética o diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones.

Existen varios estimadores de la variabilidad genética que se emplean cuando se trabaja con secuencias de ADN, las más comunes son: Diversidad genética (H), Diversidad de Nucleótido π , Frecuencia de haplotipo, Diversidad haplotípica (H_d). La variabilidad genética puede ser reducida en poblaciones pequeñas y una escasa variabilidad genética disminuye la capacidad de una población a adaptarse a cambios ambientales, generando una disminución de la capacidad de adecuación por parte de los individuos; por esto, el

mantenimiento de las poblaciones requiere la preservación de la variabilidad genética (Tajima, 1983; Nei, 1987).

En el análisis de secuencias donde existen diferencias entre haplotipos de una sola base se consideran diferentes por lo que generalmente los valores de H obtenidos de secuencias son altos. Si los valores de H obtenidos a partir de secuencias son cercanos a uno, no es posible diferenciar loci o subpoblaciones, por lo que esta medida pierde valor para interpretación biológica (Tajima, 1983; Nei, 1987). Es decir, si hay mucha variedad dentro de los haplotipo, estos no se pueden diferenciar.

Los cuellos de botella se producen cuando una población o especie ha sufrido un drástico descenso en el número de miembros en algún momento, llegando en algunos casos al borde de la extinción. Los cuellos de botella son un indicador de pérdida de diversidad genética y por ende una amenaza (endogamia y deriva génica), por eso, se debe tomar en cuenta a las especies que a pesar de estar aumentando en número no han recuperado su diversidad genética, o no ha habido una recuperación demográfica (Piñero *et al.*, 2008).

3.5.4.2.3. ÍNDICES DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Si dos poblaciones se encuentran aisladas por periodos de tiempo significativos, podrían llegar a un aislamiento reproductivo, donde se puede producir un cambio cualitativo y cuantitativo de las frecuencias alélicas, ya sea por mutación, deriva génica y/o endogamia, las cuales no estarían sujetas necesariamente a selección, ni recombinación (Giles *et al.*, 1980; Anderson *et al.*, 1981; Cann *et al.*, 1987), ya que el ADN mitocondrial no está sujeta a selección. Si un par de poblaciones no se encuentran aisladas

reproductivamente, y existe intercambio de al menos un organismo migrante que se reproduzca por generación, no es posible que ocurran procesos de diferenciación genética (Cann *et al.*, 1987). Es posible, por tanto, estimar la cantidad flujo génico (N_m) a partir de diferenciación genética entre dos poblaciones, para estimar la diferenciación genética mediante el F_{ST} que es obtenida por un análisis molecular de varianza (AMOVA). Los valores de F_{ST} representan como se encuentra distribuida la variación genética entre poblaciones y toma valores de entre 0 y 1. Los valores del estimador F_{ST} de 0 a 0,05 indican poca diferenciación genética, de 0,05 a 0,15 una diferenciación moderada, de 0,15 a 0,25 una alta diferenciación, y los valores de más de 0,25 representan una diferenciación genética muy alta (Wright, 1978).

Adicionalmente, se calcula el G_{ST} , que es el índice de diferenciación genética promedio entre poblaciones (Nei, 1973). Sus valores oscilan entre 0.00 a 0.05; 0.05 a 0.15; 0.15 a 0.25 y > 0.25 que nos enseñan si existe una pequeña, moderada, alta y elevada diferenciación genética respectivamente (Wright, 1978). La diferenciación genética entre sub-poblaciones es un indicador de la conectividad y es producida en gran parte por la diversidad de ambientes. El impacto de la fragmentación debida a actividades humanas se refleja en la estructura y en la cantidad de variación genética de las poblaciones (Marcilla *et al.*, 2002).

3.5.4.3. MICROSATÉLITES

3.5.4.3.1. CARACTERÍSTICAS

También denominados STRs (short tandem repeats) (Hancock, 1999). Los microsatélites son secuencias repetitivas de ADN constituidas de 2-6 nucleótidos (Armour

et al., 1994). Estas secuencias se encuentran distribuidas en el genoma y se caracterizan por su alta variabilidad (Tautz y Schötterer 1994; Hancock, 1999). Se desconoce todavía el significado funcional de estas secuencias, aunque la hipótesis más aceptada apunta a que están relacionados con el empaquetamiento y condensación del ADN en los cromosomas de los eucariotes (Vanhala *et al.*, 1998). Los microsatélites pueden ser utilizados como marcadores moleculares (Ellegren *et al.*, 2004). La variación en el número de repeticiones es lo que constituye los múltiples alelos, transformándolos en marcadores muy polimórficos (Tautz, 1989; Gibbs *et al.*, 1997). Su análisis está basado en la amplificación por PCR, de modo que se realiza de forma fácil, rápida, a bajo costo y la cantidad de ADN necesaria para su realización es mínima (Cheng *et al.*, 1995, Luikart y England, 1999). El número de microsatélites por genoma está relacionado con el tamaño del genoma (Ellegren *et al.*, 2004). Los microsatélites pueden analizarse empleando geles de poliacrilamida y tinción de nitrato de plata o bromuro de etidio, mediante autorradiografía o, lo más habitual, mediante sistemas automatizados de electroforesis con marcaje fluorescente (electroferogramas).

Actualmente, en el área de estructura poblacional, es donde más se ha utilizado este tipo de marcadores. El estudio de estos marcadores permite la identificación de cada alelo por locus, y obtener datos poblacionales de una determinada especie, tal como las frecuencias alélicas, además permiten estimar distancias genéticas entre poblaciones (Bowcock *et al.*, 1994; Ponsuksili *et al.*, 1999). Para ello, se han desarrollado nuevos métodos estadísticos, que se ajustan a los datos generados por estos marcadores (Slatkin 1995; Goldstein *et al.*, 1995a y b; Luikart y England, 1999). Son muchos los ejemplos de estudios de cálculo de polimorfismo y distancias genéticas entre poblaciones cercanas.

En triatominos (Rhodniini) se han realizado algunos estudios con microsatélites (Harry *et al.*, 1998; Fitzpatrick *et al.*, 2008), estudios de dispersión y análisis de procesos de re-infestación en *Triatoma infestans* (Marcet *et al.*, 2006), *T. dimidiata* (Anderson *et al.*, 2002); *T. pseudomaculata* (Harry *et al.*, 2008a). Adicionalmente, estudios para analizar la estructura genética, eventos de recolonización, existencia de flujo génico, aislamiento génico y deriva génica fueron desarrollados por Harry *et al.*, 1998a para la especie *R. pallens* al comparar poblaciones sinantrópicas (peridomiciliares y domiciliarias) vs. silvestres, ya sea a nivel local, como también entre poblaciones geográficamente distantes. Estos microsatélites fueron probados en otras especies del género *Rhodnius*, incluyendo la especie *R. ecuadoriensis*, con resultados satisfactorios de amplificación de seis microsatélites de los diez obtenidos (Harry *et al.*, 1998a; 2008b), y *R. prolixus* de Venezuela (Fitzpatrick *et al.*, 2008; 2009).

Algunos factores pueden disminuir el poder y la sensibilidad de los microsatélites como marcadores de elección, o pueden ser fuente de error que disminuya su utilidad en los estudios genéticos. Los dos principales factores son (i) alelos nulos, que es cuando un alelo no puede ser amplificado, debido, principalmente, a una mutación en el punto de hibridación del cebador. Ese alelo no amplifica y el individuo es catalogado como homocigoto (Dawson *et al.*, 1997). La existencia de alelos nulos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia es baja. El método para sospechar la presencia de alelos nulos es el cálculo de la Deficiencia de Heterocigotos para el equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), (Mundy y Woodruff, 1996; Dawson *et al.*, 1997) y (ii) homoplasia, es el hecho de que dos alelos tengan el mismo tamaño pero no debido a que sean idénticos, sino a que los tomamos como idénticos por tener el mismo tamaño, pero existen diferencias en su estructura, inserciones de una parte y deleciones de otra, cambios de bases (Primmer y

Ellegren, 1998). Éste es un tipo de polimorfismo que se puede detectar únicamente por secuenciación. Sin embargo, este marcador puede ser fuente de error en estudios poblacionales o de evolución, porque la tasa de mutación de los microsatélites está relacionada de forma compleja con el tamaño y composición del alelo, y, por ejemplo, los alelos interrumpidos o compuestos conllevan con más frecuencia a casos de homoplasia. (Tautz y Schlötterer, 1994).

La riqueza alélica puede verse afectada por el tamaño de la muestra, si el tamaño es grande, habrá un mayor número de alelos, este problema puede ser solucionado al contabilizar el número de alelos únicos dentro de una población dada (Kalinowski, 2004; Muñoz, 2011). El equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) describe el contenido genético de poblaciones diploides en términos de frecuencias alélicas. Estima la frecuencia o proporción (p y q) de dos alelos (dominante A y recesivo a) en una generación que es el resultado de una reproducción parental aleatoria y que se refleja en las siguientes proporciones: $AA = p^2$, $Aa = 2pq$, $aa = q^2$ (Hartl, 2000; Page y Holmes, 1998; Ocaña, 2010). Para que este principio se cumpla, debe darse las siguientes condiciones: (i) el apareamiento debe ser al azar (panmixia), (ii) la población es infinitamente grande (deriva génica), (iii) no se agregan genes desde el exterior de la población (flujo génico o migración), (iv) los genes no cambian de una forma alélica a otra (mutación), (v) todos los individuos tienen las mismas probabilidades de sobrevivir y reproducirse (selección). Cuando una población presenta los genotipos de las frecuencias muy similares de la generación anterior, se sugieren que la población ha alcanzado una población estable o un EHW. Sin embargo, en condiciones naturales, estos supuestos no son reales y estas desviaciones puede indicar varios eventos de endogamia, asociación, estratificación dentro de la población (Frankham *et al.*, 2002; Wigginton *et al.*, 2005) y de esta manera, afectar el

valor de la heterocigocidad observada (H_o) (Hartl, 2000; Page y Holmes, 1998; Ocaña 2010). Adicionalmente, ayuda a entender la teoría de la selección natural y de la evolución genética en organismos sexuales.

3.5.4.3.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ESTADÍSTICOS F.

La estructura poblacional se refiere solamente a las poblaciones de una misma especie. Teóricamente, las poblaciones de una especie en particular pueden cruzarse libremente. Sin embargo, las poblaciones en estado natural son más complejas, no tienen una estructura definida y no se distribuyen, ni geográfica, ni genéticamente en forma uniforme. Las poblaciones suelen agruparse y formar subpoblaciones que están aisladas unas de otras, el efecto más importante es que se evita que se produzca la panmixia (cruce libre y aleatorio). A pesar del relativo aislamiento de las poblaciones, los genes suelen moverse de una subpoblación a otra por medio del flujo génico, el cual introduce variabilidad genética en la población y evita la especiación, debido a que tiende a homogenizar las frecuencias de alelos. En la naturaleza, las poblaciones están expuestas a un balance entre dos fuerzas opuestas: (i) la disminución de la diversidad dentro de las poblaciones con un incremento de diversidad entre ellas causada por la deriva génica, y (ii) el incremento de la diversidad dentro de las poblaciones con una reducción de diversidad entre ellas causadas por el flujo génico (Page y Holmes, 2008; Ocaña, 2010). El análisis de la genética de poblaciones es útil para clasificar individuos de una muestra dentro de poblaciones y así definir hasta subpoblaciones (Pritchard *et al.*, 2000). Existen índices que facilitan la comprensión de la estructura poblacional, con información obtenida a través de los microsatélites (Fitzpatrick *et al.*, 2008). La medida de la frecuencia de ocurrencia de

estas variaciones son los estadísticos F. Los estadísticos asumen 3 niveles de estructura: en una población individual (I), subpoblaciones o en micro ambientes (S), y población total (T). La combinación de estos tres niveles da una descripción detallada de la estructura de la población (Page y Holmes, 2008).

Los estadísticos más comunes son: (i) El estadístico F_{ST} es un índice de fijación, que se usa para medir el grado de subdivisión, es decir, medir la diferenciación genética entre poblaciones en función de las frecuencias alélicas y conocer sobre la estructura de las subpoblaciones. Adicionalmente, nos indica si existe flujo génico (Freeland, 2005), divergencia, y si esta se mantiene a través del tiempo (Muñoz, 2011). Se utiliza también para estudios de extinción y recolonización (Whitlock, 1998). Su rango se encuentra entre 0 y 1. Cuando este índice es 0, nos indica que los individuos entre las subpoblaciones se distribuyen aleatoriamente. Mientras que, si este valor es +1 es indicativo de separación, divergencia génica y fijación de alelos en cada población (Freeland, 2005; De Meeus *et al.*, 2006). (ii) El estadístico F_{IS} que mide el nivel de endogamia como resultado de una desviación del valor esperado de la panmixia (cruce al azar); este valor puede variar entre -1 (todos los individuos son heterocigotos), 0 (distribución aleatoria de alelos dentro del individuo) y +1 (todos los individuos son homocigotos) (De Meeus *et al.*, 2006; Ocaña, 2010).

3.6. IMPORTANCIA DE INVESTIGAR *Rhodnius ecuadoriensis* TRANSMISOR DE LA ECh EN EL ECUADOR

La falta de información sobre la morbilidad y mortalidad de la Enfermedad dificulta el desarrollo de adecuados programas de control en el país. La falta de conocimiento sobre las distintas especies de insectos transmisores no ha permitido desarrollar

programas de Control adecuados en cada zona considerando características propias de cada región. Adicionalmente, uno de los principales retos con los que se enfrentan los países con presencia de triatomíneos son la presencia de focos residuales, en el domicilio y peridomicilio; y la presencia de triatomíneos silvestres que pueden llegar a las viviendas, visitarlas o recolonizarlas después de la aplicación del insecticida (Marquardt *et al.*, 2005).

Hasta este momento, se tiene estudios acerca del ciclo de vida y los patrones de alimentación y defecación de *R. ecuadoriensis* (Villacís *et al.*, 2008). Sin embargo, por su amplia distribución geográfica es indispensable llevar a cabo una investigación que profundice el conocimiento de esta especie y que pueda servir de base para actividades de vigilancia efectivas.

La importancia de los triatomíneos en la Salud Pública radica en su condición de ser insectos transmisores de la ECh, tanto a nivel silvestre como en los ambientes sinantrópicos (peridomiciliar-domiciliar), donde algunas especies transmiten la enfermedad a humanos y/o sus animales domésticos. Adicionalmente, las especies de mayor importancia epidemiológica son aquellas que tienen la capacidad de adaptarse a vivir en estrecho contacto con el hombre, colonizando viviendas rurales (Schofield y Galvão, 2009). Primitivamente, los triatomíneos del género *Rhodnius* se encontraron en ambiente silvestre asociados a palmeras, por ejemplo *R. pallescens* y *R. colombiensis* se encuentran asociados con *Attalea butyracea* (Susunaga *et al.*, 1991, López y Moreno, 1995) y *R. ecuadoriensis* a la palma de cade (*Phytelephas aequatorialis*). En las palmeras estos triatomíneos se encuentran relacionados con hospederos vertebrados y ocupan nidos de mamíferos (*Rattus rattus*, *Sciurus stramineus*) y aves (*Camphylorhynchus fasciatus*) (Cruz-López *et al.*, 2001, Suárez-Davalos *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2011).

Debido al proceso de destrucción y deforestación por parte del ser humano, los *Rhodniini* se fueron adaptando hacia ecotopos artificiales. Este fenómeno dinámico y actual se ve reflejado en la existencia de numerosas especies que invaden y colonizan la vivienda humana y sus alrededores (Zeledón *et al.*, 1977).

Recientemente, se están explorando los probables efectos del incremento de la temperatura debido al cambio climático global. Se ha sugerido que los cambios de temperatura podrían extender la distribución geográfica de los vectores silvestres, tanto en altitud como en latitud (Carcavallo, 1999). El aumento de la humedad relativa podría también extender la distribución de las especies existentes en los bosques tropicales y subtropicales (Giojala *et al.*, 1990). Considerando que sí la temperatura aumenta dentro de las viviendas a consecuencia del cambio climático, los vectores domiciliados podrían desarrollar ciclos de vida más cortos, aumentar la densidad poblacional (Vázquez-Prokopec *et al.*, 2003) y por ende, permitiría una transmisión del parásito, *T. cruzi*, de una manera más eficiente, que en el caso de *R. ecuadoriensis* sería un problema grave. El estudio de ésta especie ha despertado el interés de ampliar el conocimiento y comprender el proceso de adaptación que ha permitido su establecimiento en los diferentes hábitats, particularmente en el domicilio humano, donde encuentran la estabilidad, disponibilidad de alimento y refugio.

Dentro de este marco teórico se compararon y se cuantificaron las diferencias a nivel fenotípico vs. el nivel del genotipo, entre dos poblaciones de *R. ecuadoriensis* pertenecientes a dos provincias del Ecuador, situadas en dos regiones distintas (i) Centro-Costa (Manabí) y (ii) Sur-Andina (Loja), esta comparación se la realizó mediante marcadores fenotípicos (fenotipos antenales y morfometría geométrica de alas), cruces

experimentales entre individuos de las dos poblaciones y marcadores moleculares (mt Cyt b y microsatélites). Este estudio busca conocer si existen o no diferencias en el fenotipo y genotipo como también si se encuentran aisladas reproductivamente estas dos poblaciones de *R. ecuadoriensis*. El conocimiento que se necesita obtener es a tres niveles: (i) nivel geográfico (Loja y Manabí), (ii) micro ambiental o de hábitats (domiciliar, peridomiciliar y silvestre) y (iii) sexual (machos y hembras). Adicionalmente, se quiere conocer si los resultados obtenidos a nivel del fenotipo y genotipo están influenciados a nivel del ambiente o es por acción de procesos evolutivos como la selección natural y/o la deriva genética, entre otros.

3.7. OBJETIVO GENERAL

- Comparar las poblaciones de *R. ecuadoriensis* encontradas en diferentes hábitats (silvestre, peridomiciliar y domiciliar) en dos provincias endémicas para la enfermedad de Chagas en el Ecuador, utilizando como herramientas de investigación: fenotipo antenal, la morfometría geométrica alar, cruces experimentales y marcadores moleculares, mt DNA (cyt b) y microsatélites.

3.7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los siguientes objetivos específicos se plantearon con sus respectivas hipótesis:

1. Determinar si existen diferencias fenotípicas entre poblaciones de *R. ecuadoriensis* recolectadas en las provincias de Loja y Manabí, utilizando el análisis de fenotipo antenal y la morfometría geométrica alar.

H1: Las poblaciones de *R. ecuadoriensis* presentan diferencias fenotípicas (fenotipo antenal y morfometría de ala) entre las dos provincias.

H0: La población de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Loja no presenta diferencias fenotípicas (fenotipo antenal y morfometría de ala) con respecto a la población encontrada en la provincia de Manabí, Ecuador.

2. Determinar si existen diferencias fenotípicas entre poblaciones de *R. ecuadoriensis* recolectadas en los diferentes micro-ambientes [sinantrópicas (peridomiciliar y domiciliar)] vs. silvestres en las dos regiones, Costa-Centro (Manabí) y Sur-Andina (Loja) del Ecuador.

H1: Las poblaciones de *R. ecuadoriensis* recolectadas en los diferentes micro ambientes hábitats (silvestre, peridomiciliar y domiciliar) presentan diferencias fenotípicas (fenotipo antenal y morfometría de ala) dentro de cada región (Costa-Centro y/o Sur-Andina).

H0: La población de *R. ecuadoriensis* recolectada en los diferentes micro-ambientes (silvestre, peridomiciliar y domiciliar) no presenta diferencias fenotípicas (fenotipo antenal y morfometría de ala) dentro de cada región (Costa-Centro y/o Sur-Andina).

3. Determinar si existen diferencias fenotípicas entre machos y hembras de poblaciones de *R. ecuadoriensis* recolectadas en los diferentes micro-ambientes en las provincias de Loja y Manabí del Ecuador.

H₁: Existe dimorfismo sexual en el fenotipo antenal y morfometría de ala en *R. ecuadoriensis* recolectados en los diferentes micro-ambientes de las dos provincias (Loja y Manabí).

H₀: No existe dimorfismo sexual en el fenotipo antenal y morfometría de ala en *R. ecuadoriensis* recolectados en los diferentes micro ambientes de las dos provincias (Loja y Manabí).

4. Determinar si existe aislamiento reproductivo entre las poblaciones de *R. ecuadoriensis* recolectadas en las dos regiones, Costa-Centro (Manabí) y Sur-Andina (Loja), utilizando cruces experimentales.

H₁: Existen barreras reproductivas entre las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis* manifestada en la baja fertilidad y viabilidad de huevos producidos en los cruces experimentales.

H₀: No existen barreras reproductivas entre las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis*, manifestada en la baja fertilidad y viabilidad de huevos producidos en los cruces experimentales.

5. Analizar y comparar la estructura genética entre poblaciones de *R. ecuadoriensis* recolectadas en las diferentes comunidades de las provincias de Loja y Manabí, utilizando marcadores moleculares como mt Cyt b y microsatélites.

H₁: La población de *R. ecuadoriensis* de Loja presenta diferencias genéticas con respecto a la población recolectada en la provincia de Manabí- Ecuador.

H₀: Las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Loja (Sur-Andina) y Manabí (Centro-costa) no presentan diferencias genéticas.

6. Analizar y comparar la estructura genética entre poblaciones de *R. ecuadoriensis* recolectados en los diferentes micro-ambientes o hábitats (silvestre, peridomiciliar y domiciliar) en las dos regiones, Costa-centro (Manabí) y Sur-Andina (Loja) del Ecuador, utilizando el marcador molecular (mt Cyt b).

H₁: Las poblaciones sinantrópicas (domiciliares y peridomiciliares) de *R. ecuadoriensis* de Loja y Manabí constituyen una fracción aleatoria del pool genético silvestre.

H₀: Las poblaciones sinantrópicas (domiciliares y peridomiciliares) de *R. ecuadoriensis* de Loja y Manabí no constituyen una fracción aleatoria del pool genético silvestre, al contrario, existen genotipos asociados con la capacidad de infestar los ambientes sinantrópicos (domiciliares y peridomiciliares).

7. Evaluar los microsatélites previamente diseñados para *Rhodnius pallescens*, en poblaciones de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Loja y Manabí en estudios de genética de poblaciones.

H₁: Los seis microsatélites diseñados para *R. pallescens* son informativos tanto para las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Loja como de Manabí- Ecuador.

H₀: Algunos microsatélites diseñados para *R. pallescens* no son informativos tanto para las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Loja como de Manabí- Ecuador.

8. Comparar los resultados obtenidos con las técnicas de estudio del fenotipo vs. los resultados obtenidos con las técnicas de estudio del genotipo.

H₁: Los análisis moleculares y morfométricos nos permiten llegar a similares conclusiones respecto a las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de diferentes hábitats (silvestre, peridoméstico y doméstico) en las dos regiones del Ecuador.

H₀: Los resultados obtenidos a nivel molecular y morfométrico arrojan diferente información respecto a las poblaciones de *R. ecuadoriensis*, en diferentes hábitats en las dos regiones del Ecuador.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

Se escogieron dos provincias (Loja y Manabí), las cuales son consideradas como endémicas para la Enfermedad de Chagas (Figura 6). El estudio se llevó a cabo en 21 comunidades rurales, ocho comunidades en Manabí y trece en Loja (Tabla 1; Figuras 7 y 8).

4.1.1. PROVINCIA DE MANABÍ

La provincia de Manabí, se localiza al noroccidente del Ecuador continental, entre los paralelos 0 al norte y 2 al sur, y los meridianos 79 al oriente y 81 al occidente. Esta provincia se caracteriza por poseer una mezcla de clima subtropical seco y húmedo. Tiene una superficie aproximada 18.878 Km² y está al oeste del Océano Pacífico, posee 350 km de playa. Tiene una altitud promedio de 60 [metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m)] y una temperatura promedio de 25 °C. Su pluviosidad anual es de 563 mm (INAMHI, 2011). Esta provincia está dividida en 22 cantones. En la Tabla 1 y Figura 7 se muestran las ocho comunidades que fueron visitadas en el Cantón Portoviejo, que se encuentran dentro de la zona ecológica que corresponde a bosque deciduo (Sierra, 1999). Sin embargo, Manabí comprende ocho zonas ecológicas que se encuentran en un rango que oscila entre los 0 a 800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) (Sierra, 1999). Las características típicas que presentan las viviendas en estas comunidades son paredes y piso de “caña guadúa” (*Guadua angustifolia*) o madera y en su mayoría con techo de palma y menor cantidad con techo de zinc (Black *et al.*, 2007); muchas de sus viviendas se encuentran cercadas por

piñuelas (*Aechmea magdalenae*) (Grijalva *et al.*, 2011), lugar propicio para albergar y mantener a los triatominos sin necesidad de llegar al intradomicilio. Sus habitantes se dedican a la agricultura, principalmente a los cultivos de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), naranjas (*Citrus sinensis*), plátano (*Musa paradisiaca*), yuca (*Manihot esculenta*), maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*) (Villacís *et al.*, 2010). Adicionalmente, en estas comunidades, existen palmeras, como la palma de coco (*Cocus nucifera*), y la palma de tagua (*Phytelephas aequatorialis*), ésta última, tiene una gran importancia económica en esta provincia, ya que se utiliza sus frutos para la manufacturación de artesanías y las hojas para la construcción de techos en las viviendas (Henderson *et al.*, 1995; Southgate 1997; Pintaud *et al.*, 2008); en el nacimiento de las hojas de esta palmera puede albergar a nidos de mamíferos, facilitando el refugio a los triatominos. Otra fuente de ingresos económicos es el comercio, actividad que se realiza con los sitios aledaños de estas comunidades (Pinto, 2005; Villacís, 2006).

4.1.2. PROVINCIA DE LOJA

La provincia de Loja se encuentra al extremo sur occidental del país, tiene una superficie aproximada 11.730 Km², y se caracteriza por presentar una topografía montañosa, con relieve muy irregular de altitudes que oscilan desde los 700 m y sobrepasan los 3.700 m; esta provincia presenta 16 cantones. Los accidentes geográficos más representativos son las Cordilleras del Bunque, San José, Tambo Blanco, De la Paz, del Salal, de los Altos, Los Guabos, entre otras; y en cuanto a la red hidrográfica presenta al sur-este los ríos Zamora, San Francisco, Trapichillo, Tambo Blanco, de los Corazones, La Merced, Peñas Encantadas, Sordomoras, el Ingenio, entre otros (INEC, 2009). Esta región tiene una pluviosidad anual de 400 mm, presentando dos estaciones lluviosas y dos

secas, una de las estaciones lluviosas va desde febrero a mayo y la otra desde octubre a noviembre. De las estaciones secas, la primera comprende desde junio a septiembre y la otra desde diciembre a enero (INAMHI, 2011). Las comunidades presentan terrenos irregulares con sus viviendas alejadas unas de otras. En la provincia de Loja, se tomaron en cuenta trece comunidades (Tabla 1), bajo los 2.200 m.s.n.m y pertenecen a las siguientes zonas ecológicas: bosque deciduo, bosque semi-deciduo, matorral seco y bosque siempre verde, las comunidades seleccionadas para este estudio se muestran en la Figura 8.

Las viviendas en estas localidades se caracterizan por presentar paredes de adobe, piso de tierra y techos de teja, casa muy típica en esta zona (Black *et al.*, 2007); sus habitantes se dedican a cultivar caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), café (*Coffea arabica*), maíz (*Zea mays*), maní (*Arachis hypogaea*) y árboles frutales como: papaya (*Carica papaya*) y naranja (*Citrus sinensis*) (Villacís *et al.*, 2010).

4.2. COLECTA DE TRIATOMINOS - *Rhodnius ecuadoriensis*

La recolección de triatominos se realizó en tres micro ambientes o hábitats: domiciliar, periodomiciliar y silvestre. El trabajo de campo, se efectuó bajo normas estrictas de bioseguridad y cuidado, para lo cual fue indispensable el uso de pantalones, guantes, mascarilla, zapatos cerrados, camisa de manga larga y casco de trabajo.

Las búsquedas en los tres hábitats se llevaron a cabo con la colaboración de asistentes de campo del Programa Nacional de Chagas (PNCh) y el Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM), además del apoyo del personal del Centro de

investigación de Enfermedades Infecciosas (CIEI) y estudiantes que participaron en los programas del Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Ohio.

El trabajo de campo, se realizó bajo el protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), Ecuador, y de la Universidad de Ohio, Estados Unidos, (OU). Además se realizó bajo el permiso de colección de triatominos avalado por el Ministerio del Ambiente N° 008RM-DPM-MA.

4.2.1. RECOLECCIÓN DE TRIATOMINOS EN EL AREA SINANTRÓPICA (DOMICILIO Y PERIDOMICILIO).

En cada de una de las viviendas se explicó el propósito de la visita al jefe de familia y sus habitantes y se solicitó la participación voluntaria mediante la aplicación de un consentimiento informado, el cual debió ser firmado por parte del jefe de la familia (Anexo 1). Una vez obtenido su permiso escrito y verbal, se procedió a la toma de coordenadas, mediante el GPS (Garmin eTrex Summit®), y con una cámara fotográfica (Canon, PowerShot A495) se tomó cuatro fotos de la vivienda, para obtener una foto de cada lado de la misma (9A).

El equipo de trabajo fue conformado de aproximadamente tres personas, un entrevistador y dos entomólogos de campo. El entrevistador realizó las preguntas de las encuestas de viviendas (Anexo 2) con el fin de conocer datos socio-económicos. La encuesta registró la presencia de animales domésticos, tipo de vivienda, entre otras cosas como información utilizada para estudiar los factores de riesgos de la ECh (no incluidos en este estudio). Los entomólogos de campo realizaron las búsquedas entomológicas.

Las búsquedas en ambientes sinantrópicos (domiciliares - peridomiciliares) se efectuaron por un tiempo de 1 hora/ hombre, tal como lo describe Grijalva *et al.*, (2005a). El tiempo total de búsqueda fue de aproximadamente 30 minutos,. Cada equipo buscó por 10 minutos dentro de la vivienda y 10 minutos afuera de la misma. Si no se encontraron triatomíneos vivos, se aplicó insecticida piretroide irritante (0.2% pyrethrina ExciteR™, Prentiss Inc., Sandersville, GA) con los chisquetes de mano y se continuó la búsqueda por 10 minutos adicionales.

Las búsquedas domiciliarias comprendieron las habitaciones humanas, preferentemente dormitorios, huecos de las paredes de adobe especialmente en la provincia de Loja, adicionalmente, se buscó debajo del colchón, camas y detrás de los cuadros (Figura 9B).

A nivel del peridomicilio se realizaron búsquedas en nidos de gallinas, cuyeras, chancheras, montículos de piedras, maderas, leña, ladrillos, cúmulos de productos agrícolas, bodegas y demás estructuras cercanas a la vivienda. En el peridomicilio, al ser considerado como el área alrededor de los dormitorios donde se realiza la actividad cotidiana y se alojan los animales domésticos (Gürtler, 1999), se buscó en material acumulado, como teja, ladrillos, madera, y hasta desperdicios agrícolas, pudiendo abarcar un radio de hasta 20 m alrededor de cada una de las viviendas (Figura 9C).

Si en una vivienda se encontró al menos un triatómino vivo se la consideró como vivienda infestada y se procedió a recolectar los triatóminos y colocarlos en un frasco de plástico (9cm x 5cm y 4cm de diámetro) etiquetándolo con marcador indeleble en la parte exterior con el código de la vivienda, la fecha y el lugar exacto dónde se encontraron (Ej.

en las tablas de la cama), además se colectaron exuvias y huevos. Dentro del frasco se colocó un papel filtro con numerosos pliegues a manera de acordeón a fin de dar refugio a los especímenes. Inmediatamente se preparó la vivienda y se procedió al rociado con insecticida piretroide deltametrina wettable powder (Biotrine 5%) a una concentración de 25 mg a.i./m² (ingrediente activo). Cada carga de 100 gr. de insecticida fue disuelta en 8 litros de agua en una bomba Hudson Xpert. Esta metodología se efectuó de una manera sistemática y con todas las precauciones necesarias, acompañadas con el uso de equipo adecuado tal como se describe en Grijalva *et al.* (2011) (Figura 9D).

Al finalizar la búsqueda entomológica y el rociado, si la vivienda fue infestada, se procedió a anotar en la ficha de reporte entomológico (Anexo 3) los datos obtenidos del GPS, conjuntamente con el nombre completo del jefe de familia, código de la vivienda, fecha y los resultados de la búsqueda entomológica. Se anotó el estatus de la vivienda (infestada / no infestada / cerrada / deshabitada / renuente). También se colocó detrás de la puerta una tarjeta de visita en la cual se reportó la actividad que se realizó (Anexo 4) y se colocó un calendario en la pared del dormitorio, a la altura de la cabeza, etiquetado con la fecha y el número de la casa. El calendario sirve a manera de un instrumento de detección pasiva, donde en la siguiente visita se puede revisar si tiene indicios de presencia de heces, exuvias o triatominos propiamente dichos. Adicionalmente el calendario se utiliza para que los miembros de la comunidad reconozcan a los triatominos y que recuerden las recomendaciones para prevenir su presencia en la vivienda. Finalmente, a los habitantes de cada casa se les entregó un frasco de plástico con tapa rosca para que coloquen los insectos que encuentren en el futuro. Este frasco fue etiquetado con el nombre del jefe de familia y el código de la vivienda (Figura 9E).

Algunos especímenes analizados en este estudio fueron capturados por los mismos pobladores en el domicilio. Estos especímenes fueron designados como del hábitat domiciliar.

4.2.2. RECOLECCIÓN DE TRIATOMINOS EN EL AREA SILVESTRE

En el área silvestre, se realizaron búsquedas manuales y al azar en los siguientes microhábitats: nidos de mamíferos y aves, madrigueras, huecos en troncos y árboles, entre raíces o corteza de plantas y bajo acumulaciones de troncos o rocas; estos hábitats se relacionan con la biología de los triatomos (Figura 10) (Noireau *et al.*, 2002). En algunas comunidades de la provincia de Loja como La Ciénega, Santa Rosa y Galápagos, las búsquedas se realizaron alrededor de las mismas, a una distancia de hasta 3 km, en sitios donde se encontraron nidos de mamíferos y aves (árboles y arbustos) (Grijalva y Villacís 2009).

En la comunidad de Naranjo Dulce también de la provincia de Loja, y la comunidad de Bejuco y Maonta Debajo de Manabí, las búsquedas silvestres se realizaron en un cuadrante de 600 x 600 m (Suarez-Davalos *et al.*, 2010), éste muestreo se enfocó en 62 puntos escogidos al azar, en los que se revisó los diferentes microhábitats anteriormente descritos; la búsqueda se realizó en un radio de 10 metros por un tiempo estimado de media hora en cada punto.

Las búsquedas silvestres en la provincia de Manabí se realizaron en palmeras del género *Phytelephas aequatorialis*, incluyéndose además la colocación de trampas “Noireau” (Noireau *et al.*, 1999) en el nacimiento de las ramas (Figura 10) y también en

otros microhábitats. La distancia promedio del hábitat domiciliar al hábitat silvestre fue de aproximadamente 500 m. De cada microhábitat muestreado se obtuvo la siguiente información: presencia o ausencia de triatomo (infestado / no infestado), tipo de animal al que perteneció el nido o madriguera, especie de planta en la que se encontró el microhábitat, altura del suelo (a la que se encontró el microhábitat), vegetación circundante, y observaciones ecológicas relevantes como: presencia de sembríos cercanos, palmas, vegetación espesa o abierta, y características relacionadas a biología de animales hospederos (Anexo 5) (Suárez, 2008).

4.2.3. CONTAJE DE LOS TRIATOMINOS RECOLECTADOS EN EL CAMPO

Si la vivienda o el nido fue clasificado como infestado/o, se procedió a llenar la ficha de conteo para conocer el número de especímenes recolectados, y de esa manera, confirmar el número exacto de triatomos encontrados (Anexos 6 y 7).

Los frascos colectados tanto en el área sinantópica y silvestre fueron posteriormente trasladados con el permiso de movilización y transporte otorgado por el Ministerio del Ambiente (N° 008RM-DPM-MA) y bajo las normas de bioseguridad al insectario del CIEI de la PUCE para su respectiva evaluación.

4.3. IDENTIFICACION TAXONÓMICA Y ANÁLISIS DE TRIATOMINOS

Los insectos recolectados de los diversos hábitats, fueron identificados empleando las claves de identificación taxonómica (criterios morfológicos) publicadas por Lent y

Wygodzinsky (1979) y Carcavallo *et al.* (1998). Los insectos fueron examinados, a fin de comprobar su infección natural con tripanosomátidos (*T. cruzi* y *T. rangeli*); este proceso fue efectuado por el personal de la unidad de Biología Molecular y Celular del CIEI.

4.4. ÍNDICES ENTOMOLÓGICOS

Para el análisis de los datos recopilados se determinó los indicadores entomológicos recomendados por la (WHO, 2002):

- (i) **Índice de Infestación (IIn)** = # de viviendas/nidos infestadas/os por triatominos / # total de viviendas/nidos examinadas/os x 100.
- (ii) **Índice de Densidad (ID)** = # de triatominos capturados / # total de viviendas/nidos examinadas/os
- (iii) **Índice de Hacinamiento (IH)** = # de triatominos capturados / # de viviendas/nidos infestadas/os.
- (iv) **Índice de Colonización (IC)** = # de viviendas/nidos con ninfas de triatominos / # de viviendas/nidos infestadas/os por triatominos x 100.

Los índices de Densidad (ID) y Hacinamiento (IH) no se multiplican por 100, ya que no expresan porcentaje (%), sino el promedio de triatominos por vivienda o nido. Mientras que los índices de Infestación (IIn) y Colonización (IC) si se expresan en porcentaje (%). Este último es muy importante ya que muestra el porcentaje de

viviendas/nidos donde se encuentran poblaciones nuevas de triatominos (ninfas) y de esta manera permite evaluar el impacto de las medidas de control de un determinado insecto transmisor.

4.5. SELECCIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA PARA LAS DIFERENTES TÉCNICAS (FENOTÍPICAS Y MOLECULARES).

Se analizaron un total de 333 especímenes de *R. ecuadoriensis*. Para cada tipo de análisis se determinó el tamaño de muestra mínimo necesario y se seleccionaron los especímenes representativos de las diferentes poblaciones tal como está descrito a continuación.

Para el análisis del fenotipo antenal se analizaron un total 99 especímenes (48 hembras y 51 machos) de las dos regiones. De éstos, 59 fueron recolectados en la provincia de Loja (22 en el ambiente silvestre, 21 en el peridomicilio y 16 en el domicilio) (Anexo 8), y 40 en Manabí (20 en el ambiente silvestre y 20 en el peridomicilio) (Anexo 9). No se analizó ningún espécimen en el domicilio en la provincia de Manabí. El análisis de solamente 99 antenas de *R. ecuadoriensis*, se debió a que muchos de los especímenes colectados tenían estropeadas las antenas, además que para estudios de fenotipo antenal es suficiente 15 muestras por poblacion o subpoblación (Catalá *et al.*, 2004).

Para el análisis de morfometría geométrica se analizaron 237 hemiélitros derechos, los cuales incluyeron las 99 muestras analizadas para el Fenotipo antenal, más 138 muestras adicionales, las cuales fueron separadas en 119 hembras y 118 machos. Por hábitat, en Loja se examinaron 48 especímenes en el ambiente silvestre, 47 en el

peridomicilio y 41 en el domicilio (Anexo 8). En Manabí, fueron estudiados 35 especímenes en el área silvestre, 59 en el peridomicilio y 7 en el domicilio (Anexo 9). Según Bookstein (1996), para el análisis de morfometría geométrica el número de individuos analizados por grupo debe ser al menos el doble del número de caracteres medidos en cada población y/o subpoblación. En este caso se midieron 8 puntos de referencia tomados en las alas. Adicionalmente, los programas necesitan de al menos 15 especímenes por población para que puedan correr los análisis.

En el análisis de ADN mitocondrial, mt Cyt b, se analizaron 168 secuencias de *R. ecuadoriensis*, que incluyeron 22 secuencias en el hábitat silvestre, 49 en el peridomicilio y 30 en el domicilio de Loja (Anexo 8). En Manabí se examinaron 30 especímenes en el silvestre, 31 en el peridomicilio y 6 en el domicilio (Anexo 9). Para realizar este estudio, se analizaron 100 secuencias hasta obtener un número de determinado de haplotipos, posteriormente se aumentó un 60%, hasta que el número de haplotipos ya no varió exponencialmente, de tal manera, que llegó a estabilizarse.

Finalmente, para el análisis de microsatélites se amplió el tamaño muestral, las muestras seleccionadas ascendieron a 333, que fueron separadas 208 en Loja y 125 en Manabí. En Loja se analizaron 52 especímenes del hábitat silvestre, 113 del peridomiciliar y 43 del domicilio (Anexo 8). En Manabí se examinaron 48 del hábitat silvestre, 66 del peridomicilio y 11 del domicilio (Anexo 9). En este análisis mientras más grande sea el tamaño muestral la técnica nos brinda una mayor información (Abad-Franch y Monteiro, 2005).

4.6. ANÁLISIS DEL FENOTIPO

4.6.1. ANÁLISIS DEL FENOTIPO ANTENAL

Se examinaron 48 hembras y 51 machos recolectados de los tres hábitats en las dos provincias (Anexo 10). Para la comparación entre especies, se utilizaron antenas de hembras de *R. pallescens* (n = 6) y de *R. colombiensis* (n = 5) de la colección del Laboratorio de Referencia de la Red ECLAT en el CRILAR (Anexo 11). Las antenas fueron extraídas y colocadas en tubos eppendorff con glicerina-PBS, para su conservación. Por su pequeño tamaño, las antenas de esta especie no necesitaron de procesamiento especial para la decoloración y neutralización (Catalá, 2000). Cada antena se colocó entre porta y cubreobjetos y se examinó en microscopio óptico a 400 aumentos (Leica, DB LB 100T, Alemania).

Con la ayuda de una cámara de dibujo (LEICA, LEITZ DMLB, HC PLAN 10X20, Alemania), se mapearon los sensilla identificados como mecanoreceptores y quimiorreceptores de acuerdo a Catalá y Schofield (1994). Entre los mecanoreceptores se contaron Bristles (BR); y entre los quimiorreceptores tenemos: Thin-walled trichoid (TH/TPF-Tricoide de pared fina), Thick-walled trichoid (TK/TPG-Tricoide de pared gruesa), y Basiconica-Basicónico (BA), en la cara ventral de los 3 segmentos distales de la antena [pedicelo (P), y los dos segmentos del flagelo (F1) y (F2)]. Posteriormente, se efectuó el recuento de cada tipo de sensillum en cada segmento (Figura 11).

4.6.1.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL FENOTIPO ANTENAL

El análisis estadístico del fenotipo antenal se realiza mediante análisis univariado. Se obtuvieron promedios y desviación estándar del número y tipo de sensilla antenales de cada segmento. Mediante análisis discriminante se obtuvo la ubicación de los individuos en dos ejes. El mismo análisis nos permitió conocer qué porcentaje de los individuos se clasificaron correctamente y cuáles de ellos se quedaron fuera de los grupos asignados. Adicionalmente, se utilizó la prueba de Levene para calcular la homogeneidad de las varianzas. Las variables con homogeneidad fueron analizadas mediante ANOVA, y las variables que mostraron heterogeneidad fueron analizadas mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis.

Para el análisis multivariado se analizó el set de datos mediante el programa PADWIN v80, software Dujardin 2007, <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>, el cual permitió realizar análisis discriminante, y estimar la significancia estadística con la corrección de Bonferroni mediante los valores de Wilks y las distancias de Mahalanobis. Estas distancias permitieron conocer la magnitud de la proximidad o separación de los grupos analizados y de esta manera, ayudó a la construcción de dendrogramas. Estos árboles permiten realizar dendrogramas filogenéticos ya que toman en cuenta la variación no compartida entre grupos o sea los caracteres derivados o apomórficos (Jaramillo, 1999). Adicionalmente, mediante el test de permutaciones (1000 permutaciones), y la clasificación cross-checked (control cruzado) fue posible validar de manera no paramétrica la re-clasificación de los especímenes, para lo cual se utilizaron 9 variables (Pedicelo: BR); (Flagelo 1 y Flagelo 2: BR, TPF, TPG, BA) que se definieron como fenotipo antenal. El árbol UPGMA basado en las distancias de Mahalanobis fue construido mediante el paquete

PHYLIP v.3 (Felsenstein, 2007) (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) y el módulo de TREEDYN 198 (Chevenet, 2006) (<http://www.treedyn.org>).

4.6.2. ANÁLISIS DEL HEMIÉLITRO DERECHO: MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

Se analizaron 237 individuos (119 hembras y 118 machos) de los tres hábitats (domiciliar, peridomiciliar y silvestre) en la Provincia de Loja y de los dos hábitats (peridomicilio y silvestre) en la Provincia de Manabí. En esta última provincia no se hallaron colonias intradomiciliares de este triatomino, sin embargo, siete individuos, (5 hembras y 2 machos) fueron analizados aquí como especímenes domiciliarios, ya que llegaron por la noche volando a las viviendas y fueron capturados por los pobladores en las comunidades del Bejuco, Jesús María y Maconta Abajo.

Las alas de cada individuo fueron extraídas y colocadas en tubos eppendorff en alcohol al 70% para su conservación. Para su digitalización, el hemiélitro o ala derecha de cada individuo se colocó sobre un cubreobjetos y se fotografió mediante MiScope®-MIP (1.3 megapíxeles, high resolution optics, www.zarbeco.com). La colecta de puntos para los análisis de la MG, se basa en puntos de referencia denominados coordenadas, en un sistema dado de ejes [dos ejes "x, y" para datos bidimensionales (ala), tres ejes "x, y, z" para datos tridimensionales (cabeza)]. Estos puntos de colecta se denominan puntos de referencia o landmarks. Se tomaron 8 landmarks de cada ala derecha como se detalla en la Figura 12, generando las correspondientes coordenadas mediante el programa Collection of COOrdinates (COO v80), software Dujardin 2007, <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics> (Anexo 12).

Para el análisis de las distancias morfométricas, se tomaron en cuenta las coordenadas que se obtuvieron con el Programa COO v80, que junto con Software Table Space Tabulations-TETv80, software Dujardin 2007, <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>, se calcularon todas las distancias posibles entre los puntos y los convirtió en logaritmos naturales. A partir de estos datos, se construyeron matrices de varianza-covarianza para ser utilizadas en los siguientes análisis (Anexo 13).

4.6.2.1. PROCESAMIENTO DE DATOS: SUPERPOSICIÓN DE PROCRUSTERS EN EL ANÁLISIS DEL TAMAÑO Y CONFORMACIÓN DEL ALA

Las coordenadas de puntos de referencia se colectaron sin tomar en cuenta la posición del individuo en relación a los ejes "x, y", y su orientación. El algoritmo más utilizado fue el Análisis Generalizado de Procrusters (AGP), que consistió en hacer una superposición óptima de las configuraciones geométricas, utilizando los mínimos cuadrados. Este procedimiento eliminó los efectos de la escala, orientación y de posición al hacer una serie de ajustes de tamaño, de desplazamientos, traslocaciones y rotaciones algebraicas, de tal manera, que al final, permaneció la información sobre la conformación de los individuos que se orienta en una sola, y única posición central (Rohlf, 1990, Jaramillo, 1999) (Anexo 14). Los programas Morphometrics Geometrics (MOGwin v80), software Dujardin 2007, <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>, Mancova (COVwin v80), software Dujardin 2007, <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>) y PADwin v80, (Dujardin, <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>) (Dujardin, 2007) permitieron efectuar esta superposición. En estas operaciones, es indispensable homogeneizar los tamaños, hasta modificar a un mismo tamaño. Las coordenadas que resultan de la superposición de

Procrustes se llaman residuos procrusteanos, o coordenadas residuales "aligned specimens", en un sentido de alinear todas las configuraciones a lo largo de una configuración consenso.

Para visualizar las diferencias entre dos configuraciones, se aplicó la técnica de las placas delgadas ("thin-plate splines"). Para este fin, se proyectaron los residuos procrusteanos en un plan euclidiano, sobre una reja cuya deformación en relación a una configuración consenso, permitió visualizar los cambios de conformación. Estas variables llamadas deformaciones parciales ("partial warps"- PW) se utilizaron también para comparar grupos, generar mapas factoriales o árboles de clasificación.

Adicionalmente, en este proceso, se genera los partial warps (PW) o variables de conformación o variables libres de tamaño isométrico, y se obtiene el tamaño del centroide ("centroid size" - CS) de cada grupo, el cual se define como la raíz cuadrada de la suma de las distancias elevadas al cuadrado, entre el centro de la configuración de las coordenadas de puntos (landmarks) y cada landmark individual; de tal manera, que van desde todos los puntos de referencia hasta su centroide o centro de gravedad (Catalá y Dujardin, 2007b). La significación estadística de las diferencias del CS es calculada mediante el test no paramétrico basado en permutaciones (1000 corridas) (Villacís *et al.*, 2010).

El tamaño es el componente de mayor variabilidad en la forma biológica, y puede esconder la variabilidad de la conformación, por eso se analizó por separado el tamaño y la conformación, no porque uno de ellos sean menos importante, sino que los dos están envueltos en la evolución de poblaciones y especies.

La variable tamaño, es mucho más informativa que una distancia entre dos puntos, pues no representa una distancia en una sola dirección, sino tantas direcciones como puntos de referencia (Rohlf, 1999; Jarrín, 2005).

4.6.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

Los análisis discriminantes -AD- están acompañados por un test de significancia que nos indica que tan separadas están las medias (centroides) de los grupos después de la discriminación. El estadístico Wilks' Lambda se utilizó para probar la hipótesis de que las medias de los grupos (centroides) son iguales. Wilks' Lambda tiene valores entre 0 y 1, valores pequeños indican fuertes diferencias entre grupos, valores cercanos a 1, no hay diferencias (Rohlf y Marcus, 1993).

El AD, se llevó a cabo a partir de las variables de conformación para examinar la relación entre las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis* de dos provincias (Manabí y Loja), pertenecientes a los micro-ambientes (silvestre, peridomiciliar y domiciliar) y separados por sexo (machos y hembras). Para examinar el cambio alométrico, se aplicó el test de regresión multivariada considerando al tamaño como variable independiente y a la conformación como variable dependiente (Jaramillo, 1999). Las variables de conformación también fueron obtenidas mediante el análisis de AGP.

A partir de matrices de varianza-covarianza construidas con distancias convertidas a logaritmos naturales, se utiliza los análisis multivariados. Los análisis convencionales se dividen en los utilizados para el análisis de muestras únicas, sin una asignación "a priori"

de los individuos en grupos previamente definidos (Análisis de Componentes Principales, ACP) y los utilizados para el análisis de dos o más muestras (Análisis de Componentes Principales Comunes, ACPC, y Análisis de la Función Discriminante, AFD) (Jaramillo y Dujardin 2002; Adams *et al.*, 2004).

4.7. CRUCES EXPERIMENTALES - OBTENCIÓN DE LA PRIMERA GENERACIÓN (F1) DE *Rhodnius ecuadoriensis*

Antes de comenzar con el estudio de viabilidad reproductiva, se separaron ninfas del quinto estadio (NV), ya que se necesitaron triatominos vírgenes para el momento del cruzamiento. Una vez que las NV mudaron a adultos, se escogieron tanto hembras como machos (Belisário *et al.*, 2007). Se realizaron 16 cruces, entre machos y hembras en proporción dos a uno, con un total de 48 individuos (Tabla 2), a fin de conocer la primera generación (F1) y su viabilidad reproductiva en la producción de descendencia entre poblaciones de *R. ecuadoriensis* de las dos provincias (Manabí y Loja).

A los 16 cruces, se los colocó dentro de recipientes cilíndricos de plásticos de 9 cm x 5 cm y 4 cm de diámetro. Papel filtro con numerosos pliegues a manera de acordeón fue colocado dentro del frasco plástico, a fin de dar refugio a los especímenes y tapados con mallas y una tapa rosca con agujeros para permitir el intercambio gaseoso. Cada frasco fue colocado en un recipiente dentro de una incubadora bajo condiciones de humedad y temperatura controladas, con un sistema que permite utilizar calor seco o húmedo de acuerdo a las necesidades. Las condiciones en las cuales se trabajó fueron T °: 24 ± 1 °C y HR: 85% y para simular el día y la noche, se utilizaron lámparas de luz fría, de 40 watts, 110 voltios con sistemas de control para fotoperiodos de 12 horas luz/12 horas oscuridad,

con posibles variaciones de tiempo. La incubadora tiene un sistema de circulación y renovación de aire y un sistema de seguridad que impide que la temperatura sobrepase los valores programados. Una vez obtenida la población de adultos F1, se procedió a escoger al azar 20 especímenes adultos hembras y 20 machos para su estudio morfométrico.

4.7.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA PRIMERA GENERACIÓN (F1)

DE *Rhodnius ecuadoriensis*

Se obtuvieron porcentajes tanto de los cruces, como también de la producción de viabilidad y tamaño de los huevos obtenidos por cruce. Adicionalmente, se calculó el tiempo promedio de pre-ovoposición por región (Belisário *et al.*, 2007), y se compararon con los resultados derivados en los cruces entre especímenes solo de Manabí y/o Loja. La prueba de U de Mann Whitney fue utilizada para conocer si existen o no diferencias significativas en el tamaño de los huevos, como también en el tiempo de pre-ovoposición.

Los estudios de morfometría utilizaron los programas COO v80, junto con el TET v80, software Dujardin 2007, <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>, para el cálculo de las distancias posibles entre los puntos, además se construyeron matrices de varianza-covarianza para ser utilizadas en los siguientes análisis. Los programas MOG v80, COV v80 y PAD v80 (Dujardin, <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>) (Dujardin, 2007) que permitieron realizar la superposición de procrusters. Se generó los PW y se obtuvo el tamaño del centroide o centroid size (CS) de cada grupo. La significación estadística de las diferencias del CS se calculó mediante el test no paramétrico basado en permutaciones (1000 corridas) (Villacís *et al.*, 2010). Se obtuvo el estadístico Wilks' Lambda para probar la hipótesis de que las medias de los grupos (centroides) de (i) hembras Manabí vs hembras

Loja vs hembras F1 o (ii) machos Manabí vs machos Loja vs machos F1, son iguales. El Análisis Discriminante (AD) se llevó a cabo a partir de las variables de conformación para examinar la relación entre las tres poblaciones de *R. ecuadoriensis* hembras/machos Manabí, vs hembras/machos Loja, vs hembras/machos F1, pertenecientes solo al hábitat peridomiciliar, ya que son los que en mayor cantidad se tiene y con los que se realizó el experimento. Las variables de conformación fueron sometidas para el análisis multivariado (PCA), y para calcular las distancias fenéticas se obtuvieron dendrogramas, UPGMA, derivadas de las distancias de Mahalanobis entre las tres poblaciones de *Rhodnius ecuadoriensis* [(Manabí, Loja, y F1 (machos, hembras))].

4.8. ANÁLISIS DEL GENOTIPO

4.8.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN DE *Rhodnius ecuadoriensis*

Se realizó la extracción de ADN de 333 muestras recolectadas en el ambiente sinatrópico (domiciliar y peridomiciliar) y silvestre de las dos provincias, Loja (n = 208) y Manabí (n = 125). El ADN genómico fue aislado de las patas de los especímenes de *Rhodnius ecuadoriensis*, para esto se utilizó el kit de extracción de ADN DNeasy® para sangre y tejido (Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo el protocolo para tejido (Anexo 15). El volumen final de ADN genómico obtenido fue de 100µl.

Para verificar la calidad del ADN, los productos de amplificación de algunas muestras al azar fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % a un voltaje entre 70 - 100 voltios en 1X de tampón de corrida TAE (0,04Tris- 1 mM Acetato-EDTA). La

tinción de los geles se realizó con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) y visualizado en el transiluminador o bajo luz ultravioleta en el sistema de imágenes Bio Doc- It® Imaging System (UVP, Upland, CA, USA). Adicionalmente, se cuantificó y se determinó la pureza del ADN de algunas muestras al azar (1 – 1,5µl), éste procedimiento se efectuó a través de un espectrofotómetro NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 (Thermo Scientific, Wilmington, Delawer, USA).

4.8.2.GEN MITOCHONDRIAL CITOCROMO B (mt Cyt b)

4.8.2.1. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

El análisis de la secuencia de ADN en la región del gen mitocondrial citocromo B gene (mt Cyt b) se efectuó en 168 especímenes de *Rhodnius ecuadoriensis*. La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl que contiene: 2.0 µl dNTPs [200 mM], 5.0 µl GoTag [5u / µl] (Promega®, Madison, Wi USA), Colorless Go Taq™ Buffer reaction [5X] (Promega®, Madison, Wi USA), 1 µl de MgCl₂ [25mM] (Promega®, Madison, Wi USA), 0.125 µl Go Taq DNA polymerase [5u / µl] (Promega®, Madison, Wi USA), 1 µl de cada primer [10 pM]. El mt Cyt b fue amplificado usando los primers: Cyt b7432F (5'-GGAC-G(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC) y Cyt b7433R (5'-GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA) (Monteiro *et al.*, 2003).

Este estudio se basó en el tamaño del fragmento de ADN mitocondrial mt Cyt b de *Rhodnius pallescens* (414 pb), que fue utilizado para trabajos de filogenia y taxonomía molecular en las distintas especies del género de *Rhodnius* por Monteiro *et al.*, (2000).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Thermel (Bio-Rad, USA): Paso de desnaturalización inicial de 94 °C por cinco minutos; seguido de 35 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 segundos, 47 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto y un paso de extensión final a 72 °C por 10 minutos para finalizar.

Para la secuenciación, se procedió a la purificación del producto de PCR, usando las placas de membrana Multipore Multiscreen HTS (Anexo 16). Posteriormente, se realizó el ciclo de secuenciación (cycle sequencing) o (BigDye®-Terminator v1.1 y ABI PrismTM seq buffer) (Anexo 17). Para este ciclo de secuenciación se necesitó dos reacciones, una con el primer forward, y otra con el primer reverse de modo que el producto de amplificación es ADN de cadena simple. El volumen final de reacción fue de 10 µl (9 µl de master mix + 1 µl de ADN). El master mix se preparó con 0.5 µl BigDye®-Terminator Ready Reaction Mix v1.1, 2.0 µl ABI PrismTM Sequencing buffer [5X] (CDC), y 1.0 µl Primer cyt b (7432F o 7433R) [5 pM] y 5.5 µl de agua ultra pura. Esta reacción fue para generar productos marcados con nucleótidos fluorescentes.

Los tubos para el PCR fueron claramente etiquetados para evitar cualquier confusión. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en el termociclador Thermel (Bio-Rad, USA) con el siguiente protocolo de amplificación: 25 ciclos comenzando a una temperatura de 96 °C por 10 seg, posteriormente a 50 °C por 5 seg, 60 °C por 4 minutos. Los productos de esta reacción fueron purificados mediante el Kit de purificación Centri-SEP Protocol (Princeton Separations, Adelphia, NJ, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante (Anexo 18); para esto se utilizó la combinación de la Taq DyeDeoxyTM y las reacciones del ciclo de secuenciación. Posteriormente se corrió en un secuenciador

automático para los análisis genéticos (ABI 3500 xL, genetic analyzer, Applied Biosystems, USA).

4.8.2.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS MEDIANTE mt Cyt b

Una vez que ambas cadenas forward (sentido) y reverse (contrasentido) fueron secuenciadas, se procedió al ensamblaje de las mismas para obtener una secuencia consenso usando el software SeqMan (DNASTAR Lasergene 8, v8.1.2) (Kleywegt, 2005). Se editó manualmente cada electroferograma, con la finalidad de corroborar y corregir sitios en donde no se haya registrado el nucleótido correspondiente debido a la presencia de artefactos propios del proceso de secuenciación. Cada nucleótido corresponde a un código de color determinado: Adenina (A) verde, Citosina (C) azul, Guanina (G) negro, Timina (T) rosado. En el análisis de mt Cyt b pueden existir bases ambiguas. Esto se puede deber a algún artefacto en la secuenciación. Otra posible causa puede ser la presencia de heteroplasmia que consiste en la presencia de distintos tipos de ADN mitocondrial presentes en la misma célula. La heteroplasmia sugiere la existencia de diferentes plásmidos de ADN mitocondrial (mtADN) en el organismo que tienen mutaciones particulares. Por ejemplo, la W - weak (puede encontrarse en sitios no definidos entre A y T); la S - strong (C y G); la M - amino (A y C); K - Keto (G y T); la R - purina (A y G); y la Y- pirimidina (C y T) (Anexo 19).

Posteriormente, se realizó un alineamiento con todas las secuencias consenso mediante el algoritmo ClustalW implementado en el Software Bioedit v.7.0.0 (Hall, 2007) (Anexo 20). Una vez alineadas se realizó una edición manual de todas las secuencias

obtenidas de *R. ecuadoriensis*. Cada variante nucleotídica única en toda la muestra, fue verificada individualmente en los electroferogramas de las secuencias originales y cuando se encontraron bases ambiguas o surgieron dudas sobre alguna variante, se procedió a reemplazar manualmente un nucleótido por otro, de acuerdo al código de ambigüedad nucleotídica de IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry nomenclature - NC-IUB, 1986). Por ejemplo, si se obtuvo una “W” se reemplazó la A por T, o viceversa dependiendo de la claridad y altura de los picos en los electroferogramas. Aquellas secuencias que no pudieron ensamblarse, o no fueron claras en los electroferogramas, se procedió a re-secuenciarlas, para no perder información. Verificadas todas las variantes, cada secuencia que presentó una combinación diferente de variantes nucleotídicas fue considerada como haplotipo diferente.

La evaluación del modelo evolutivo de sustitución nucleotídica se realizó con el Modeltestv.3.7. (Posada y Buckley, 2004), éste permitió escoger el mejor modelo entre: TN92+I: Tamura3-parameter y HKY: Hasegawa-Kishino-Yano en distribución. El modelo que se ajustó de mejor manera a los datos obtenidos fue bajo el Criterio de Información Bayesiana (BIC) o “Bayesian Information Criterion”, las opciones que se presentaron fueron: (i) T92+I (3175.6), (ii) T92+G (3175.8) y (iii) HKY+G (3176.8).

4.8.2.3. VARIABILIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

El Software DnaSP v.5.10 (Librado y Rozas, 2009), permitió calcular la variabilidad y diferenciación genética como también el flujo entre poblaciones (provincias) y subpoblaciones (hábitats o micro-ambientes).

Los estimadores de la variabilidad genética obtenidos fueron los siguientes:

- (i) **Diversidad genética (H)**, que es una medida equivalente a la heterocigosis esperada obtenida de datos diploides, y se define como la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes (Nei, 1987).
- (ii) **Diversidad de Nucleótido (π)**, es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes, esta medida es equivalente a la diversidad genética a nivel del nucleótido (Tajima, 1983; Nei, 1987). La diversidad de nucleótido es una medida adecuada para conocer la variabilidad genética y no es tan dependiente del tamaño de muestra ni del tamaño de la secuencia analizada como H (Nei, 1987).
- (iii) **Frecuencia de haplotipo**, si un haplotipo es observado X_i veces en una muestra.
- (iv) **Diversidad haplotípica (H_d)**, es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes.

Cuanto más alto fueron estos valores, más alta fue la variabilidad genética de la población. Además para cada población se estimó la composición nucleotídica promedio (porcentaje de adenina-timina), el número de sitios polimórficos (variables sites), el número de sitios únicos (singleton sites), asignación de número de haplotipos (h) y el número promedio de sustituciones de nucleótidos (transiciones y transversiones: ts/tv).

Para conocer el índice de diferenciación genética promedio entre poblaciones se calculó el G_{ST} , obtenido por Nei, 1973 mediante el Software DnaSP v5.10 (Librado y Rozas, 2009). Este índice nos indicó si las poblaciones son homogéneas o heterogéneas. Sus valores según Wright (1978), oscilan entre 0.00 a 0.05; 0.05 a 0.15; 0.15 a 0.25 y > 0.25 que indican una pequeña, moderada, alta y elevada diferenciación genética respectivamente.

4.8.2.4. FLUJO GÉNICO (N_m) y ESTADÍSTICOS F

Se calculó además el flujo génico (N_m), el cual se define como el número de migrantes en pares de poblaciones por generación. Las estimaciones de flujo génico son obtenidas a partir de F_{ST} (Withlock y McCauley, 1998). Los valores de F_{ST} representan como se encuentra distribuida la variación genética entre poblaciones y toma valores de entre 0 y 1. Los valores del estimador F_{ST} de 0 a 0,05 indican poca diferenciación genética, de 0,05 a 0,15 una diferenciación moderada, de 0,15 a 0,25 una alta diferenciación, y los valores de más de 0,25 representan una diferenciación genética muy alta (Wright, 1978). El número promedio de especímenes migrantes por generación (N_m) entre las poblaciones se calculó utilizando el F_{ST} en la ecuación $N_m = \{(1/\Phi_{ST}) - 1\} / 2$ obtenido mediante el Software GenA1Ex v.6.0 (Peakall y Smouse, 2006).

El Software MEGA v.5.1 (Tamura *et al.*, 2007) ayudó a estimar la distancia genética estándar (d), la distancia genética dentro y entre poblaciones, y se calculó mediante el modelo Tamura 3 - parámetros (Test T92+I), basadas en las frecuencias de los haplotipos encontrados.

4.8.2.5. DENDROGRAMAS FILOGÉNÉTICOS

Un dendrograma es un tipo de representación gráfica o diagrama de datos en forma de árbol, que organiza los datos en subcategorías que se van dividiendo en otros hasta llegar al nivel de detalle deseado. Además muestra las relaciones evolutivas entre varias especies/poblaciones que se cree que tienen una ascendencia común (Woese *et al.*, 1990). Los árboles filogenéticos se elaboraron bajo el criterio de los estados intermedios (“average states”). Según este criterio, cuando hay un cambio de un nucleótido, el valor asignado es diferente dependiendo del nucleótido, esto quiere decir que no se considera el mismo valor sin tomar en cuenta el nucleótido (Hodge y Cope, 2000).

Según Nei (1996) y Page y Holmes (1998), ninguno de los métodos actuales de reconstrucción filogenética ha probado ser el mejor en todas las situaciones. Se conoce tres métodos para el análisis filogenético: (i) Neighbor-Joining o vecino más próximo (NJ) (Saitou y Nei, 1987); (ii) Maximum Likelihood (ML), máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981) y (iii) Máxima Parsimonia (MP) (Fitch, 1977). El método NJ es un método basado en distancias genéticas y los métodos ML y MP son métodos basados en caracteres, en los que cada posición de la secuencia se considera un carácter y cada una de las cuatro bases un estado del carácter, pudiendo considerarse como quinto estado las indels (inserciones y deleciones). El método del vecino más próximo (NJ) se basa en encontrar pares de OTUs (Operational Taxonomic Units, es decir, unidades taxonómicas operativas) que minimicen la longitud total de las ramas del árbol en cada paso del agrupamiento. La estimación de las longitudes de las ramas se obtiene por el método de los mínimos cuadrados. Los datos obtenidos fueron la base para la construcción de dendrogramas, para el análisis se empleó el algoritmo de NJ, con el cálculo de bootstrap en base a 1000 réplicas; como también la

construcción de árboles filogenéticos mediante el ML en el programa MEGA v.5.1 (Tamura *et al.*, 2007). Para realizar este análisis, se concatenó los alineamientos correspondientes a los genes, y se incluyó como grupo externo 5 secuencias obtenidas de la especie hermana, *R. pallescens*, 4 de ellas obtenidas del GenBank, cuyos números de acceso fueron GQ850481 – FJ229358.1, FJ229359.1, FJ229357.1; y una secuencia del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

Finalmente, para establecer conexiones de red (Median Joining Networks) entre los haplotipos de las poblaciones se usó el programa NETWORK v. 4.6.0.0. (Bandelt *et al.*, 1999) (<http://www.fluxus-engineering.com>).

4.8.3. MARCADOR NUCLEAR – MICROSATÉLITES

Para el análisis de la estructura genética de las poblaciones se utilizaron los 6 microsatélites que fueron diseñados para *Rhodnius pallescens*, especie cercana de *R. ecuadoriensis* (Harry *et al.*, 1998). Los productos de PCR con un éxito de amplificación en *R. ecuadoriensis* fueron L3, L9, L13, L25, L43 y L47, mientras que en *R. prolixus* solo amplificaron para L43 y L47 (Harry *et al.*, 1998). La Tabla 3 muestra los productos de PCR de los diferentes locus de *R. pallescens* que varían entre 88 y 297 pb.

Primeramente, se evaluó la especificidad y reproducibilidad de cada marcador usado y se optimizaron las condiciones de amplificación cuando fue necesario. Posteriormente, se evaluó el polimorfismo de los seis microsatélites en una muestra de 10 individuos. El criterio usado para definir si un locus es lo suficientemente polimórfico para realizar el estudio genético-poblacional fue dependiendo del número y frecuencia de alelos

(Marcet *et al.*, 2006). Con los loci que resultaron polimórficos se llevó a cabo el estudio de las 333 muestras de *R. ecuadoriensis* de las dos regiones (Loja n = 208 y Manabí n = 125).

4.8.3.1. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

La amplificación se llevó a cabo en un volumen de reacción de 15 µl que contiene: 3.195 µl de agua extra pura, 1.5 µl de 5X Buffer colorless Go Taq® DNA polymerase [5U/µl], 0.5 µl de MgCl₂ [25 mM], 1.2 µl de dNTPs [200 mM], 3.75 uM de primer marcado (forward), 3.75 ng/ul de primer (reverse).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Thermel (Bio-Rad, USA), con las siguientes condiciones: denaturalización inicial 94 °C por 5 min; seguido por 30 ciclos a 94 °C por 30 sec, cambiando la temperatura de annealing dependiendo del locus (L3: 47 °C, L9: 55 °C, L13: 60 °C, L25: 58 °C, L43: 56 °C, L47: 59 °C) por 30 sec, seguido 72 °C por 1 min para todos los loci de microsatelites, excepto L9 que requirió: 72 °C por 1'30'' y un ciclo final de elongación a 72 °C por 10 min. Para la determinación del tamaño de fragmento amplificado (genescan reaction) se preparó una mix con 1 µl del producto de amplificación, el cual estaba compuesto de 10 µl de HiDi™ Formamide y 0.5 µL del marcador de peso molecular GeneScan™ 500 Rox™ (Warrington, UK).

4.8.3.2. DETERMINACIÓN DE ALELOS

El análisis de los fragmentos se realizó mediante el secuenciador ABI Prism MT3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La determinación del tamaño de los alelos se realizó mediante el software GeneMapper™ v.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Anexo 21) en base a una comparación con la escalera estándar. La determinación de los alelos de las 333 muestras se realizó después de un chequeo manual para detectar errores, inconsistencias y el apareamiento de picos causados por artefactos (Anexo 22).

Adicionalmente, el GeneMapper™ v.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) software se utilizó para analizar y a detectar el o los eletroferogramas señalando el o los alelos marcado/s. Esta revisión se realizó sin conocimiento previo de la comunidad, solo se conoció el origen geográfico (Loja o Manabí) y el hábitat. Se incluyó ADN *R. pallescens* como control positivo de amplificación en la estandarización de condiciones de PCR para cada locus, ya que los microsatélites fueron diseñados para esta especie.

4.8.3.3. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES.

Para contestar el objetivo planteado en el presente estudio: cuantificar la diversidad genética inter e intra poblacional y evaluar las relaciones entre poblaciones sinantrópicas (domiciliares y peridomiciliares) y silvestres de *R. ecuadoriensis* de las provincias de Loja y Manabí, se calcularon varios índices estadísticos basados en las frecuencias alélicas y la heterocigocidad de cada población (Freeland, 2005).

Se utilizaron índices de heterogeneidad, conectividad, similaridad y divergencia. Esto permitió evaluar las diferencias génicas entre poblaciones y, de este modo, analizar las frecuencias génicas de las poblaciones de *Rhodnius ecuadoriensis* en su distribución.

El índice de similaridad se basa principalmente en mutación y deriva génica, y se lo conoce como la Disimilaridad Standard de Nei (1973). Con esta medida se estima el promedio de sustituciones de codones por locus. Este modelo se basa en el modelo de alelos infinitos (Kimura y Crow, 1964), donde se asume que de una población ancestral se originaron varias subpoblaciones, que divergieron por deriva genética y mutación. Para el cálculo de estas distancias se utilizó el programa GenAlEx v.6.0 (Peakall y Smouse, 2006); adicionalmente, se generó una matriz de distancias genéticas conocida como D_{AS} , la misma que se calculó tomando en cuenta la similaridad de las poblaciones (Peakall y Smouse, 2006) y se estimó la distancia genética entre ellas. Este índice fue calculado por medio de las frecuencias alélicas dentro de una población en relación al número de alelos presentes en el locus, conocida como identidad genética. El valor de las distancias genéticas puede variar de cero al infinito. Las poblaciones que tienen una identidad genética similar presentan valores cercanos a cero (Freeland, 2005).

La distancia genética se evaluó a nivel geográfico y a nivel micro ambiental. A nivel de micro ambiente incluyó comparaciones entre los diferentes hábitats; y a nivel geográfico se consideraron diferencias entre las dos regiones (Loja y Manabí). Adicionalmente, se utilizaron dendrogramas para visualizar las relaciones entre las poblaciones estudiadas tanto a nivel geográfico como a nivel de subpoblaciones (hábitats).

Por medio del programa GenAlEx v.6.0 (Peakall y Smouse, 2006), se estimó la variabilidad genética de acuerdo a la proporción de polimorfismo de cada locus, número de alelos por locus, el promedio del número de alelos y la heterocigocidad, mediante equilibrio Hardy-Wienberg usando el test exacto de Chi-cuadrado (Prueba χ^2) se calculó y se comparó la heterocigocidad esperada (H_e) y la heterocigocidad observada (H_o), como también la frecuencia de los alelos por loci; y finalmente, se realizó el análisis de coordenadas principales (PCoA) para visualizar la estructuración genética de las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis* de las provincias de Loja y Manabí.

4.8.3.4. INDICE DE HETEROCIGOCIDAD

Los índices de heterocigocidad obseuada (H_o) y esperada (H_e) fueron calculadas en GenAlEx v.6.0 (Peakall y Smouse, 2006). Estos índices permiten cuantificar la diversidad genética dentro de una población (Freeland, 2005). Las muestras que se encuentran en EHW demuestran que son una población en panmixia (apareamiento aleatorio entre individuos) y por tanto, no van a mostrar diferencias significativas entre el H_e y H_o mientras que una población que no está en EHW muestra un exceso de homocigotos (Efecto Wahlund) o déficit de heterocigocidad (Page y Holmes, 1998, Freeland, 2005).

Adicionalmente, cada loci fue evaluado individualmente para determinar su nivel de desviación con las proporciones de EHW y su significación estadística (p) fue determinada después de la corrección de Bonferroni, para limitar la posibilidad de cometer un error tipo I y rechazar la hipótesis nula.

4.8.3.5. INDICE DE FIJACIÓN (F_{ST}) y DIVERSIDAD GENÉTICA

Para determinar la estructura poblacional, es decir, corroborar la definición de las poblaciones existentes dentro de un set de datos se utilizó el índice F_{ST} (como una medida de fijación), para obtener éste índice se utilizó el Software GenAlEx v.6.0 (Peakall y Smouse, 2006), que infiere la presencia de distintas poblaciones asignando cada individuo a una población en base a sus genotipos y frecuencias alélicas. El modelo infinito de islas utilizado por Wright (1943) como base para la valoración del flujo genético, se basa en dos parámetros: tamaño de la población (N) y la tasa de migración (m). Matemáticamente se define como $F_{ST} = 1/(4N_m + 1)$, donde la fuerza de la deriva génica es proporcional a $1/N$, mientras que la fuerza del flujo génico es proporcional a m (Neigel, 2002). La proporción de migrantes en una generación se conoce como Flujo Génico (N_m) (Beals *et al.*, 2000). Matemáticamente se define como $N_m = (0,25 (1 - F_{ST})) / F_{ST}$ (Neigel, 2002). Se utilizó el Software ARLEQUIN v.3.5. (Excoffier y Lischer, 2010), por lo que al comparar pares de poblaciones se puede conocer si hay una distribución aleatoria de individuos entre ellas o si se trata de subpoblaciones separadas (por ejemplo por hábitat). Los valores de éste índice varían entre 0 (distribución aleatoria) y 1 (separación de los grupos), todos los grupos fijos para uno de los alelos disponibles). Valores superiores a 1 indica que hay suficiente flujo génico como para negar efectos por deriva génica (Beals *et al.*, 2000). Valores bajos de F_{ST} producen altos niveles de flujo génico (De Meeus *et al.*, 2006). Los valores del estimador F_{ST} de 0 a 0,05 indican poca diferenciación genética, de 0,05 a 0,15 una diferenciación moderada, de 0,15 a 0,25 una alta diferenciación, y los valores de más de 0,25 representan una diferenciación genética muy alta (Wright, 1978).

La diversidad genética (A) se calculó por medio del programa FSTAT v.2.932. Este índice representa el número de alelos por locus, y permite calcular la diversidad dentro de la población (Freeland, 2005) y corrige la variación causada por el tamaño de la muestra (Leberg, 2002). También se consideró el número de alelos únicos en cada población (alelos exclusivos o privados (AE) y número de migrantes por generación (N_m) (Kalinowski, 2004).

4.8.3.6. ÍNDICE DE ENDOGAMIA (F_{IS})

El término endogamia es usado para describir varios fenómenos relacionados, todos ellos referentes a situaciones en donde los apareamientos ocurren entre parientes (endogamia biparental) o consigo mismos (endogamia uniparental) y que tienen como consecuencia que dos alelos homólogos heredados a la progenie sean idénticos entre sí por descendencia de un alelo ancestral en común (Waser y Prince, 1993). Es decir, los eventos que tienen como consecuencia apareamientos endogámicos, incrementan los niveles de homocigosis en una población (Hartl, 2000; Hedrick, 2000). Este valor fue calculado a través del programa ARLEQUÍN v.3.1 (Excoffier y Lischer, 2010), este índice es el F_{IS} , o coeficiente de endogamia, que evalúa el nivel de endogamia entre los individuos que puede producir una desviación de la panmixia como resultado de un apareamiento no aleatorio. Este coeficiente puede tomar un valor de -1 a 1 . Si es de 0 no hay endogamia y la población está en EHW. Cuando el valor es negativo, significa que hay un exceso de heterocigotos y si es positivo que hay un exceso de homocigotos, ya que cuando $H_o < H_e$ se asume que en esa población se produjeron más apareamientos endogámicos de lo que se espera por azar (Frankham *et al.*, 2002; De Meecus *et al.*, 2006).

4.8.3.7. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA)

El PCoA fue graficado utilizando el programa GenAlEx 6.0 (Peakall y Smouse, 2006). Su objetivo fue producir un gráfico de pocas dimensiones, que abarque la mayor cantidad posible de la variación total, en donde los patrones de distancias entre los puntos dentro del plot sean lo más cercanas a la matriz original (Jolliffe, 2002). Las matrices utilizadas para este análisis fueron: distancias genéticas de Nei (1973) e índice de fijación (F_{ST}).

4.8.3.8. ANÁLISIS DE VARIANCIA MOLECULAR (AMOVA).

La estructura genética de las poblaciones y los niveles de variación en los individuos fueron analizados con el Análisis de Variancia Molecular (AMOVA). Para este cálculo se utilizaron dos programas ARLEQUIN v.3.5. (Excoffier y Lischer, 2010) y GenAlEx v.6.0 (Peakall y Smouse, 2006). Con este análisis se calculó los componentes de variación y sus niveles de significación (basado en procedimientos de permutación) para los niveles jerárquicos: entre poblaciones y dentro de las poblaciones.

4.8.3.9. AISLAMIENTO POR DISTANCIA

La relación entre distancia genética y distancia geográfica se obtuvo mediante una prueba de Mantel que evalúa la correlación entre dos matrices de disimilitud [distancia genética (D_{AS}) vs. distancia geográfica en km] (Sokal, 1979). La significación estadística fue evaluada mediante el programa GenAlEx v.6.0 (Peakall y Smouse, 2006), a través de 9,999 permutaciones (Fitzpatrick *et al.*, 2008; Ocaña, 2010). Este análisis fue realizado con

las muestras de las provincias, Manabí y Loja, a pesar, de que el muestreo en la provincia de Manabí abarca un área geográfica restringida a un solo cantón (Portoviejo), lo que no sucede con la provincia de Loja.

5. RESULTADOS

5.1. ÍNDICES ENTOMOLÓGICOS EN LAS COMUNIDADES ESCOGIDAS EN LA PROVINCIA LOJA

En total de 505 casas en las 13 comunidades durante los años 2005, 2006 y 2007, se capturaron 4.642 triatominos de cuatro especies: *Rhodnius ecuadoriensis*, *Triatoma carrioni*, *Panstrongylus chinai* y *P. rufotuberculatus*. Se obtuvo un índice de infestación (IIn) total del 18,8% para las 13 comunidades. Santa Ester y Galápagos fueron las comunidades que presentaron el más alto IIn de 29,6 y 29,4% respectivamente. En cuanto al índice de densidad total (ID) en las 13 comunidades fue de 9,2 y el de índice de hacinamiento (IH) total fue de 49 triatominos encontrados por vivienda infestada. Al desglosar por comunidad infestada, El Limón presentó el IH más bajo con 3 triatominos, mientras que Tuburo presentó el valor mayor 181 triatominos por vivienda infestada, es decir una proporción de 60 a 1. El Índice de Colonización (IC) total fue de 78,9 %. (Tabla 4).

Rhodnius ecuadoriensis, es la especie más abundante y se encontró en las 13 comunidades, siendo en su mayoría colectados en el peridomicilio, especialmente en nidos de gallina, cuyeras, y en acumulaciones de madera y leña. 286 especímenes de esta especie se recolectaron en el intradomicilio. El hábitat intradomiciliario presentó un IIn de 6,5%, un ID = 0,6; un IH = 8,7 y un IC de 81,8% (Tabla 5), en este caso existe una proporción de 60 triatominos en el intradomicilio entre las comunidades de Naranjo Dulce y La Extensa. Mientras que el hábitat peridomiciliario presentó más altos índices de IIn, ID, IH y IC de 10,1%; 7,7; 76,1 y 92,2% respectivamente (Tabla 6), si comparamos el IH en el

peridomicilio tenemos una proporción de 30 a 1 triatominos entre las comunidades de Naranjo Dulce ($n = 7$) y Tuburo ($n = 212$). *Triatoma carrioni*, es un especie que se encuentra presente especialmente en el cantón Espíndola, esta especie se ha recolectado tanto dentro de las viviendas (debajo del colchón), en los agujeros de las paredes como también en el peridomicilio (nidos de gallina). *Panstrongylus chinai*, se encontró en su mayoría dentro de las viviendas (intradomicilio), entre las rendijas de las paredes; y *P. rufotuberculatus*, al igual que *P. chinai* se recolectó principalmente en el intradomicilio (Datos no mostrados).

En cuanto a las búsquedas silvestres en la Provincia de Loja, *R. ecuadoriensis*, fue la única especie, presentó un IIn total de 13,1% y un IC de 82,1% (Tabla 7), siendo la Ciénega la comunidad que más alto índice de infestación presentó en el ambiente silvestre IIn= 21,9%.

5.2. ÍNDICES ENTOMOLÓGICOS EN LAS COMUNIDADES ESCOGIDAS EN LA PROVINCIA MANABÍ

De un total de 481 casas en las 8 comunidades. Se capturaron 3.212 triatominos de tres especies: *Rhodnius ecuadoriensis*, *Panstrongylus howardi* y *P. rufotuberculatus* obteniéndose un índice de infestación (IIn) total del 21,8% para las 8 comunidades. La Encantada fue la comunidad que presentó el más alto IIn de 30,1%. En cuanto a los índices de densidad y hacinamiento total fueron de ID = 6,7 y IH = 30,6. La comunidad de Quebrada de Maconta presentó los ID e IH más elevados (ID = 19,1) e (IH = 79,5) (Tabla 8). Sin embargo, a pesar de que la Encantada presentó el más alto IIn (30,1%), tiene un hacinamiento de 10 triatominos por vivienda infestada, en una proporción de 8 a 1 si comparamos con la comunidad de Quebrada de Maconta ($n = 80$). Tanto en la comunidad

de Zapallo como la de Naranjo Adentro, solamente se buscó en una vivienda, por eso, se realizaron los cálculos, pero no se tomaron en cuenta en el momento de escoger como los índices entomológicos más elevados.

Rhodnius ecuadoriensis es la especie más representativa, en su mayoría fue recolectada en el peridomicilio, especialmente en nidos de gallina (construidos con hojas de plátano), cuyeras, y en acumulaciones de madera y leña (lugar asociado con nidos de ratas). Las Tablas 9 y 10 muestran que el peridomicilio presenta un mayor índice de infestación $I_{In} = 13,7\%$; mientras que en el ambiente domiciliar el I_{In} fue de $4,8\%$. De igual manera, el IC en el peridomicilio fue de $86,4\%$, mayor que en el domicilio $IC = 4,3\%$. En cuanto, al índice de hacinamiento, la comunidad e Bejuco presentó una proporción de 14 a 1 si comparamos con Quebrada de Maconta en el peridomicilio. *Panstrongylus howardi*, es otra especie que se encontró en su mayoría en el peridomicilio asociados a nidos de rata y en las acumulaciones de ladrillos, y *P. rufotuberculatus* se encontró mayoritariamente en el peridomicilio al igual que las dos especies antes mencionadas (Datos nos mostrados).

La Tabla 11 nos enseña los indicadores entomológicos de *R. ecuadoriensis* en el ambiente silvestre en dos comunidades (Maconta Abajo y Bejuco). Se recolectó un total de 345 insectos, de los cuales solo uno espécimen perteneció a *P. howardi* (Suarez-Davalos *et al.*, 2010).

5.3. ANÁLISIS DE FENOTIPO DE *Rhodnius ecuadoriensis*

5.3.1. FENOTIPO ANTENAL DE *Rhodnius ecuadoriensis*

La antena de *Rhodnius ecuadoriensis* está formada por cuatro segmentos, como en todos los triatomíneos: escapo, pedicelo, y dos segmentos flagelares: flagelo 1 y flagelo 2. Esta es la primera vez que se describe el fenotipo antenal de un número tan amplio de especímenes de esta especie (*R. ecuadoriensis*, $n = 99$). Siguiendo la tipología antenal de los Rhodniini el pedicelo presenta mecanorreceptores: trichobotrias y bristles, y carece de sensilla quimiorreceptores de tipo tricoide y basicónica. En el flagelo 1 (F1) y 2 (F2) se observan Bristles (BR), Tricoides de pared fina (TPF), Tricoides de pared gruesa (TPG) y Basicónicos (BA). En la Tabla 12 se muestra el promedio y desviación estándar del número de sensilla antenales, clasificados según su tipo y posición en la antena, en ambos sexos (hembras y machos) y por hábitat en la Provincia de Loja. La Tabla 13 nos indica, el promedio y la desviación estándar del número de sensilla antenal en ambos sexos y en dos hábitats en la Provincia de Manabí. La Tabla 14 muestra el número y tipo de sensillas antenales de *R. ecuadoriensis*. Los resultados muestran diferencias significativas entre los especímenes de Loja y Manabí. Otros sensilla de tamaño mucho menor (1μ aprox) no se consideraron en este trabajo pero han sido descritos por Catalá y Schofield (1994) mediante microscopía electrónica de barrido.

5.3.1.1. VARIACIÓN GEOGRÁFICA DE FENOTIPO ANTENAL DE *Rhodnius ecuadoriensis*

Las poblaciones de Manabí se diferenciaron de las de Loja por tener un mayor número de BR en el pedicelo, adicionalmente tanto TPF y TPG en el flagelo 1 (F1) como TPG del flagelo 2 (F2) mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) (Tablas 12 y 13; Figura 13). Se diferencia claramente las poblaciones de hembras (Figuras 14A y 14B) y machos de las dos provincias (Figuras 15A y 15B) mediante el análisis discriminante, como también en el dendrograma derivado de las distancias de Mahalanobis. La Figura 14A nos indica la amplitud fenotípica de los especímenes silvestres comparando con las hembras del peridomicilio y domicilio.

Si comparamos especímenes del mismo hábitat, en cada provincia, los individuos colectados en el hábitat silvestre de Manabí, presentaron un mayor número de BR en pedicelo y TPG en el F1 y F2 que los colectados en el mismo hábitat de Loja ($p < 0.001$). Los *R. ecuadoriensis* colectados en el hábitat peridomiciliar de Manabí, poseen un mayor número de TPG y TPF en el F1 que los correspondientes de Loja ($p < 0.005$).

5.3.1.2. DIMORFISMO SEXUAL EN EL FENOTIPO ANTENAL DE *Rhodnius ecuadoriensis*

En la provincia de Loja se comprobó la existencia de diferencias sexuales en el fenotipo antenal de los individuos colectados en el hábitat domiciliar (Figura 16A). Las hembras domiciliarias de *R. ecuadoriensis* de Loja presenta un menor número de TPF y TPG, tanto en el F1 y F2, que los machos (F1 $p = 0.006$ y F2 $p = 0.003$) (Tablas 14A y

14B; Figura 16B). Los especímenes pertenecientes a los hábitats silvestre y peridomiciliar tanto en Loja como en Manabí no se observaron diferencias sexuales en el fenotipo antenal.

5.3.1.3. VARIACIÓN POR HÁBITAT EN EL FENOTIPO ANTENAL DE *Rhodnius ecuadoriensis*

En la provincia de Manabí no se encontraron diferencias en el fenotipo antenal entre los hábitats. Mediante el análisis univariado, en la población de Loja se detectó un mayor número de TPG en el F2 de las hembras peridomiciliares respecto a las domiciliarias y a las silvestres ($p < 0.01$). Al comparar los machos de *R. ecuadoriensis* del hábitat peridomiciliar, éstos presentaron un mayor número de BR en el pedicelo y TPG en el F2 que aquellos que se encuentran en el hábitat silvestre ($p < 0.05$) (Tabla 13).

El Análisis Discriminante (AD) con las mismas variables generado con el Software PADwin v80 y las distancias de Mahalanobis, confirma estas diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las hembras del domicilio vs. las del peridomicilio (Figura 14A). Mediante una clasificación cross-check, se obtuvo un 83 % de clasificación correcta dentro del fenotipo domiciliar, un 80 % dentro del fenotipo peridomiciliar, y un 43 % del fenotipo silvestre.

5.3.1.4. COMPARACIÓN EN EL FENOTIPO ANTENAL ENTRE TRES ESPECIES DEL COMPLEJO *pallenscens*

El fenotipo antenal de las tres especies del complejo *pallenscens* (*R. colombiensis*, *R. pallenscens* y *R. ecuadoriensis*) presentan, como los demás Rhodniini: BR en el pedicelo, y los cuatro tipos de sensilla característicos de los dos segmentos flagelares, en la Tabla 15 se muestran los promedios y la desviación estándar del número de sensilla en hembras de las tres especies. Presentaron diferencias significativas los BR del pedicelo y del F1 y los TPF, TPG y BA del F1 y F2 ($p < 0.001$), *R. ecuadoriensis* fue la especie que mostró menor cantidad de todas las sensilla antenales antes mencionadas.

Las distancias de Mahalanobis generadas por el AD entre las tres especies fueron altamente significativas ($p < 0.001$), diferenciando al grupo norte *R. pallenscens* - *R. colombiensis* con el grupo sur *R. ecuadoriensis* (Loja y Manabí) (Figura 17 A y B).

Todos los individuos de *R. colombiensis* y *R. pallenscens* fueron correctamente clasificados, mientras que los *R. ecuadoriensis* se clasificaron en un 95 %, el 5 % restante (un espécimen), se clasificó como *R. pallenscens*.

5.4. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL HEMIÉLITRO DERECHO DE *Rhodnius ecuadoriensis*

5.4.1. VARIACIÓN GEOGRÁFICA DEL TAMAÑO (CS) DEL ALA

Se encontraron diferencias significativas en el tamaño (CS) de las alas de los especímenes de *R. ecuadoriensis* colectados en Manabí comparando con los especímenes recolectados en la provincia de Loja ($p < 0.001$), siendo más grandes las alas de *R. ecuadoriensis* de Manabí tanto hembras como machos (Figura 18).

5.4.2. DIMORFISMO SEXUAL DEL TAMAÑO (CS) DE ALAS DE *Rhodnius ecuadoriensis*

Se comprobó un marcado dimorfismo sexual del CS tanto en Loja como en Manabí ($p < 0.001$). Las alas de las hembras de *R. ecuadoriensis* presentaron un mayor tamaño que las de los machos, según se muestra en la Figura 19. En Manabí, las diferencias sexuales fueron mucho más marcadas entre los especímenes del peridomicilio ($p = 0.00004$) que en los del hábitat silvestre ($p = 0.0213$).

5.4.3. VARIACIÓN DEL TAMAÑO (CS) DE ALAS DE *Rhodnius ecuadoriensis* POR HÁBITAT

En la Figura 20 se muestra el análisis por hábitat, para cada provincia, no se observaron diferencias atribuibles al hábitat en el tamaño del ala, ni en hembras ni en machos de Loja. En Manabí se comprobó que las hembras del hábitat peridomiciliar tienen

un mayor tamaño alar que las silvestres ($p < 0.05$), mientras que los machos no presentaron diferencias entre los hábitats (peridomicilio y silvestre).

5.4.4. VARIACIÓN GEOGRÁFICA Y SEXUAL DE LA CONFORMACIÓN DE ALAS DE *Rhodnius ecuadoriensis*

El análisis de la conformación de las alas demostró la existencia de dimorfismo sexual en los especímenes de Loja pero sólo en el hábitat domiciliar. La contribución del tamaño sobre la conformación del ala fue del 45 % y 52 % para las hembras ($p = 0.000$). Adicionalmente, se observaron diferencias significativas de la forma del ala entre las poblaciones de ambas provincias. El modelo alométrico fue aceptado tanto para hembras como machos, y la distancia computada de alometría libre y los “partial warps” - PW fueron significativos ($p < 0.001$).

5.4.5. VARIACIÓN DE LA CONFORMACIÓN DEL ALA DE *Rhodnius ecuadoriensis* POR HÁBITAT

Al comparar la conformación del ala derecha entre los especímenes de los diferentes hábitats en cada provincia, se demostró que no hubo ninguna diferencias en la forma del ala entre los dos sexos en la provincia de Manabí, pero si hubo diferencias en la conformación del ala solo en las hembras del domicilio de la provincia de Loja. Los especímenes recolectados en el hábitat silvestre difieren en la conformación con los obtenidos en el peridomicilio y domicilio en ambos sexos.

En cuanto a la Disparidad Métrica (DM) de la forma del ala analizados tanto en machos y hembras de los tres hábitats de las dos poblaciones, nos mostraron que los especímenes de ambos sexos de Manabí presentaron una menor DM que los especímenes de Loja y en ($p < 0.05$). Cuando se comparó la conformación del ala entre los hábitats, se demostró que existía una menor DM entre los machos del hábitat silvestre de Manabí, y una mayor DM en las hembras de Loja del hábitat domiciliario (Tabla 16). Este análisis nos indica la varianza obtenida bajo la hipótesis de la limitación de la diversidad dependiendo de la influencia genética o ambiental.

Al comparar la conformación alar entre las dos provincias se encontraron diferencias muy significativas ($p < 0.001$), con un marcado efecto alométrico (39% CV1 y 5% CV2), es decir las diferencias de conformación podrían explicarse por la variación del tamaño. En los individuos colectados en la provincia de Loja, se observó un escaso efecto alométrico sobre la conformación alar en las hembras (1% CV1 y 0% CV2) y en los machos (6% CV1 y 0% CV2). Este efecto fue mayor en la provincia de Manabí (hembras 7% CV1 y 0% CV2, machos 3% CV1 y 9% CV2).

No se observaron diferencias de conformación entre sexos y hábitats. En las Figuras 21 y 22 se observan los dendrogramas, UPGMA, obtenido del Análisis Discriminante (AD) con las variables de conformación por sexo y hábitat, como también la separación entre las hembras domiciliarias de Loja ($p < 0.001$) con las del peridomicilio y silvestre.

La Tabla 17 nos muestra un resumen de la comparación entre variables fenotípicas de *R. ecuadoriensis* en relación a región geográfica, hábitat y sexo.

5.5. CRUCRES EXPERIMENTALES - PRIMERA GENERACIÓN (F1) DE *R. ecuadoriensis*

5.5.1. CICLO REPRODUCTIVO, TIEMPO DE PRE-OVOPOSICIÓN, VIABILIDAD Y TAMAÑO DE HUEVOS

El 87,5% de los 16 cruces entre machos y hembras de *R. ecuadoriensis* de las dos provincias tuvieron éxito, es decir, 14 de los 16 cruces lograron producir huevos y su puesta (pre-ovoposición y ovoposición). Los 16 cruces de Loja y Manabí produjeron 760 huevos (32%), sin embargo, de éstos solo 243 eclosionaron hasta el primer estadio ninfal (NI).

Los 20 cruces entre especímenes de *R. ecuadoriensis* sólo de Loja, utilizados como grupo control, produjeron un total de 1.734 huevos, de éstos, 1.491 huevos (86%) eclosionaron, similarmente el grupo control de 20 cruces entre individuos de Manabí, 1.338 huevos eclosionaron de los 1.687 (79%) (Tabla 18).

Los cruces experimentales de las hembras de *R. ecuadoriensis* de Manabí presentaron un tiempo de pre-oviposición de $15,5 \pm 1,5$ días; similar a lo observado en el ciclo reproductivo entre machos y hembras solo de Manabí ($15,5 \pm 0,05$ días). En Loja las hembras de *R. ecuadoriensis* con machos de Manabí en los cruces experimentales mostraron un tiempo promedio de pre-ovoposición de $13,6 \pm 0,08$ días, menor al observado en el ciclo reproductivo de machos y hembras solo de Loja ($16,5 \pm 0,03$ días) (Tabla 18). Sin embargo, los cruces experimentales no mostraron una diferencia significativa en el

tiempo de pre-ovoposición al comparar con los especímenes de los grupos control $p = 0.991$ en Manabí, $p = 0.466$ en Loja.

El tamaño de los huevos (mm) de esta especie obtenidos durante el ciclo reproductivo entre especímenes solo de Loja presentaron un tamaño promedio de $1,55 \pm 0,27$ mm, a diferencia de los de huevos obtenidos en el ciclo reproductivo entre especímenes solo de Manabí que midieron $1,79 \pm 0,25$ mm. El tamaño promedio de los huevos obtenidos en los cruces experimentales fueron de $1,71 \pm 0,13$ mm para Loja y $1,76 \pm 0,13$ mm para Manabí (Tabla 18).

El análisis U Mann Whitney, permitió observar diferencias significativas al comparar el tamaño de los huevos puestos entre los de especímenes solo de Manabí y solo Loja ($p < 0.001$), como también, el tamaño de huevos derivados en los cruces experimentales vs. los huevos de Loja. No se mostraron diferencias significativas en el tamaño de los huevos puesto entre los cruces de especímenes solo de Manabí, respecto a los obtenidos en los cruces experimentales ($p = 0.534$).

5.5.2. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE ALAS DE LA PRIMERA GENERACIÓN F1

En cuanto al análisis morfométrico, el AD generado con el Software PADwin y las distancias de Mahalanobis, confirma las diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las hembras del peridomicilio de Loja vs. el de Manabí, sin embargo, las hembras obtenidas en la primera generación (F1) se encuentran compartiendo características de hembras de ambas poblaciones (Figura 23A). Mediante una clasificación cross-check, se observó que

el tamaño alar de las hembras F1 se clasificaron correctamente en un 52% ($n = 9/17$). Las 8 hembras F1 restantes se clasificaron, 4 de ellas dentro de hembras de Loja y las otras dentro de las hembras de Manabí. Las hembras solo de Loja se clasificaron correctamente un 78% dentro del tamaño alar peridomiciliar de esa región, y las hembras de Manabí se clasificaron correctamente en un 83% (Figura 23A).

La Figura 23B nos muestra un dendrograma de las distancias fenéticas derivadas de las distancias de Mahalanobis, agrupando a las hembras F1 con las de Loja, y separadas con las de Manabí.

La Figura 24A nos indica como resultado del análisis discriminante como se encuentran separados los machos de Manabí vs. los de Loja y vs. los obtenidos en los cruces experimentales (F1). Mediante la clasificación cross-check, se obtuvo un 82% de los machos de la F1 ($n = 14/17$) clasificados de manera correcta como machos dentro de este grupo (primera generación), los 3 restantes, se separaron dos machos dentro de los machos de Loja y uno dentro de los machos de Manabí. Los machos de Loja tienen una clasificación del 100% dentro del tamaño alar de peridomiciliar de esa región, y los machos de Manabí se clasifican en un 96%.

El dendrograma de las distancias fenéticas derivadas de las distancias de Mahalanobis muestra acercamiento entre los machos de la F1 con los de Loja, separándose de los machos de Manabí (Figura 24B).

5.6. ANÁLISIS DEL GENOTIPO DE *Rhodnius ecuadoriensis*

5.6.1. GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO B (mt Cyt b) DE *Rhodnius ecuadoriensis*

5.6.1.1. GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO B (mt Cyt b) DE *Rhodnius ecuadoriensis* EN LAS PROVINCIAS DE MANABÍ Y LOJA

Este es el primer estudio con un adecuado número de secuencias analizadas de la especie de *R. ecuadoriensis* ($n = 168$) de las dos provincias, 95 muestras de la provincia de Loja y 73 de la provincia de Manabí, que incluye 33 muestras del domicilio, 86 del peridomicilio y 49 del hábitat silvestre en ambas provincias. De estas 168 muestras se obtuvo una secuencia consenso de 607 pares de bases (pb) de longitud; 553 pb de las 607 fueron consideradas como secuencia conservada.

Las secuencias obtenidas del gen mt Cyt b no presentaron inserciones y/o deleciones “indels”, tal como se esperaría para variantes mitocondriales intraespecíficas. El número de sitios polimórficos o sitios variables (S) del mt Cyt b en ambas provincias fue de $S_{TOTAL} = 53$, que representa 8,73 %. Las secuencias de los individuos de Loja mostraron un mayor número y porcentaje de sitios polimórficos ($S_{LOJA} = 39$; 6,42%), que los de Manabí ($S_{MANABÍ} = 31$; 5,10%). Las poblaciones de ambas regiones presentan 4 sitios únicos o “singletons”, en las posiciones 23, 266, 407 y 578 pb; y 49 sitios informativos de parsimonia.

5.6.1.2. ESTIMADORES DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Rhodnius ecuadoriensis* EN LAS PROVINCIAS DE MANABÍ Y LOJA

Como era de esperarse para los marcadores mitocondriales con alto nivel de polimorfismo, se encontró un gran número de haplotipos (H) en *R. ecuadoriensis* de las dos provincias ($h = 36$), 15 haplotipos exclusivos en Loja y 18 en Manabí; y tres haplotipos compartidos entre las dos poblaciones, que son los haplotipos 6 (HELM6), 9 (HELM9) y 13 (HELM13). En este estudio, se evidenció una gran diversidad haplotípica (H_d) para ambas regiones, siendo $H_{dTOTAL} = 0.9313 \pm 0.007$ (Tabla 19). Los valores estimados para el índice de polimorfismo (θ) y de diversidad nucleotídica (π) fueron: $\theta_{TOTAL} = 0.01535$ y $\pi_{TOTAL} = 0.01641 \pm 0.00385$. Siendo este último índice, el más elevado para población de Loja, mostrando diferencias en la diversidad en nucleótidos (Tabla 20). La composición de los nucleótidos en Loja fue de Citosina (C = 33.17%), Timina (T = 34.76%), Adenina (A = 19.90%) y Guanina (G = 12.17%) y en Manabí C = 28.38%, T = 40.04%, A = 19.93% y G = 11,66%.

5.6.1.3. NEUTRALIDAD SELECTIVA Tajima's *D* EN POBLACIONES DE *Rhodnius ecuadoriensis*

Se calculó la prueba estadística de Neutralidad selectiva Tajima's (*D*) utilizando el programa MEGA v.5.1 (Tamura *et al.*, 2007). Esta prueba estadística nos indicó si la población está decreciendo o incrementándose. Los resultados muestran que la población de Manabí está en incremento ($D_{MANABÍ} = -0.83680$), mientras que la población de Loja al

ser positivo su valor ($D_{LOJA} = + 1.88900$) se encuentra decreciendo. El valor obtenido al analizar las dos poblaciones fue $D_{TOTAL} = + 0.208802$ (Tabla 19).

La Ttabla 20 nos muestra el número de haplotipos, sitios polimórficos por cada hábitat en las dos provincias ($D =$ domicilio, $s =$ silvestre y $p =$ peridomicilio). El test de Neutralidad selectiva Tajima's (D), en la población de Loja fue de $+ 1.88900$, al desglosar por hábitat, encontramos que en el domicilio el valor fue de $D_D = + 1.85474$, en el ambiente silvestre fue de $D_S = + 0.54302$, y en el peridomicilio fue de $D_P = + 2.13433$, con una significación $p < 0.05$. En la misma tabla muestra a la población de Manabí que presentó un valor de $D_{MANABÍ} = - 0.83680$. Al desglosar por hábitat en esta provincia, los valores también fueron negativos, indicándonos que se encuentra igualmente en incremento. Sus valores fueron de $D_D = - 0.84821$, $D_P = - 0.49764$ y $D_S = - 0.39144$ en el domicilio, peridomicilio y silvestre respectivamente, con una significación de $p > 0.05$.

El test Fu Li (D) (Fu y Li, 1993), calculado por el DnaSP v.5.10 (Librado y Rozas, 2009) muestra que su valor es significativo en la provincia de Loja (2.0575) a diferencia de Manabí (- 1.8236); y que a nivel de microambientes (hábitats) en Loja son significativos tanto para el domicilio y peridomicilio, más no para el silvestre (Tabla 20). En Manabí ninguna de las subpoblaciones fueron significativas (Tabla 20).

5.6.1.4. HAPLOTIPOS OBTENIDOS EN POBLACIONES DE *Rhodnius ecuadoriensis* EN LAS PROVINCIAS DE MANABÍ Y LOJA

En la Tabla 21 se observa que para la provincia de Loja, los haplotipos 1 (HEL1), 3 (HEL3) y 8 (HEL8) fueron los más comunes en este estudio, lo que representa un 18.95%

de los especímenes respectivamente, mientras que los haplotipos 4 (HEL4), 5 (HEL5), 10 (HEL10), 13 (HELM13) y 14 (HEL14) fueron los menos comunes, 1.05% de los especímenes respectivamente. Mientras que en la provincia de Manabí, el haplotipo 22 (HEM22) fue el más común de los haplotipos, 26,03%. El haplotipo 9 (HELM9) (13.7%) y los haplotipos 20 (HEM20), 21 (HEM21), 23 (HEM23), 26 (HEM26), 27 (HEM27), 28 (HEM28), 30 (HEM30), 32 (HEM32), 33 (HEM33), 34 (HEM34), 35 (HEM35) y 36 (HEM36) fueron los menos frecuentes 1.37% (Tabla 21).

El análisis filogenético de las secuencias de genes entre *R. pallescens* y *R. ecuadoriensis* se llevó a cabo con la mínima Evolución utilizando el método de Tamura 3 - parámetros (Test T92+I) con el programa MEGA v.5.1 (Tamura *et al.*, 2007), obtenido a partir de Neighbour Joining (NJ). El dendrograma obtenido en la Figura 25, muestra que *R. ecuadoriensis* es de origen monofilético como nos demuestra el nodo I (BT = 100%) y que los valores de bootstrap (BT) para las agrupaciones de las secuencias de *R. pallescens* (outgroup) son mayores al 80%. Se puede observar dos agrupaciones dentro del grupo de *R. ecuadoriensis*, la agrupación dada por nodo II donde se encuentran HEL8 y HEM29 (BT = 79%) y una segunda agrupación dada por el nodo III (BT = 70%), donde se encuentran el resto de los haplotipos estudiados. Aunque las agrupaciones siguientes no son significativas por sus bajos valores de bootstrap (< 65%), se puede observar al haplotipo HEL4 junto a dos agrupaciones; una agrupación dada por el nodo IV donde se encuentran los haplotipos de Loja: HEL1, HEL2, HEL3, HEL5, HEL7, HEL10, HEL11, HEL12, HEL14, HEL15, HEL16, HEL17, HEL18 y de Manabí: HEM21, HEM22, HEM23, HEM26, HEM27, HEM32; y adicionalmente, encontramos los tres haplotipos compartidos entre las dos poblaciones: HELM6, HELM9 y HELM13 indicando que comparten algunos cambios de secuencia. El nodo V nos muestra la agrupación de los

haplotipos de la provincia de Manabí: HEM19, HEM20, HEM24, HEM25, HEM28, HEM29, HEM30, HEM31, HEM33, HEM34, HEM35 y HEM36.

La Figura 26 nos indica la agrupación de los especímenes de *R. ecuadoriensis* de las dos provincias plasmada en una red de haplotipos, mediante la utilización del programa NETWORK v. 4.6.0.0. (Bandelt *et al.*, 1999). En esta se observó que de los 36 haplotipos de *R. ecuadoriensis*, tres se comparten entre las dos provincias (Loja y Manabí) (HELM6, HEMLM9 y HEMLM13), 18 son exclusivos para Manabí y 15 para Loja. Estos resultados sugieren una persistencia de polimorfismos ancestrales o de ocurrencia de flujo génico entre las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis*. Mientras que el haplotipo 8 (HEL8), conformado solamente por muestras que provienen de dos comunidades El Huayco y La Extensa, cantón Catamayo, provincia de Loja, sugiere que se encuentra aislada, sin reproducción entre los especímenes que conforman este haplotipo (HEL8) con los demás que se encuentran en el resto de la provincia de Loja. El mv que se muestra en la figura representa los ancestros hipotéticos, un ancestro hipotético fue inferido (mv1) en este estudio.

5.6.1.5. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA (G_{ST}) Y FLUJO GÉNICO (N_m)

El análisis de Nei (1973), mostró una moderada diferenciación genética entre las muestras de *R. ecuadoriensis* de las dos regiones ($G_{ST} = 0.05460$). Se encontró adicionalmente una tercera población bien notable en la provincia de Loja, presentando dos poblaciones en esta provincia y una en Manabí (Tabla 22).

En cuanto a la estructura y distancia genética, se realizó un AMOVA, el cual nos indica que la variabilidad genética existente entre las dos poblaciones, con un número de migrantes (N_m) fue de 2,24 y un índice de fijación ($F_{ST} = 0.18238$) (Tabla 22).

Respecto a la diferenciación genética entre subpoblaciones (separación por hábitat y por regiones) se observó en la Tabla 22, que *R. ecuadoriensis* del ambiente domiciliar de Loja con el domicilio de Manabí, presentó una pequeña diferenciación genética, ya que el valor $G_{ST} = 0.03550$. A diferencia entre los ambientes peridomiciliares y silvestres de las dos regiones, el valor de $G_{ST} = 0.06775$, y $G_{ST} = 0.05390$ respectivamente, en ambos casos nos indican una moderada diferenciación genética entre estas subpoblaciones. Si comparamos entre los ambientes solo de Loja, o solo de Manabí encontramos una pequeña diferenciación genética entre los mismos. Y si comparamos solo entre Manabí, encontramos que el rango entre varía entre $G_{ST} = 0.001 - 0.20$.

5.7. MICROSATÉLITES

5.7.1. TRANSFERENCIA Y ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES

Para la estandarización de los microsatélites se utilizó como base el protocolo descrito por Harry *et al.*, 1998. Después de variar las condiciones de la PCR, principalmente en el tiempo de annealing y número de ciclos se logró establecer un protocolo para la amplificación de cada uno de los microsatélites para las muestras de *R. ecuadoriensis*. Se realizó un análisis preliminar de todos los alelos para cada microsatélite ($n = 6$) en un total de 15 especímenes para determinar primeramente el grado de polimorfismo de estos marcadores. Los datos se obtuvieron por medio del programa

GeneMapper™ v.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), los mismos fueron verificados a través de la lectura manual de los alelos.

Según la lectura de los electroferogramas junto con la revisión de la lectura manual indicaron que solamente dos microsatélites fueron polimórficos, el L13 y el L47. Los loci L9 y L25 fueron marcadores monomórficos; el microsatélite L9 presentó un producto de PCR de 267 pb, mientras que el microsatélite L25 presentó un producto amplificado de 173 pb (Tabla 23; Figura 27).

Los microsatélites L3 y L43 presentaron mucha dificultad para su lectura y una variedad de alelos, los cuales no fueron tomados en cuenta en este análisis, para el locus L3 se observó alelos que oscilaron en un rango desde los 86 – 164 pb, la lectura de alelos bajo los 100 pb, pueden presentar confusiones con la lectura del polímero; mientras que para el locus L43 los alelos fluctuaban desde 124 - 176 pb (Tabla 23 y Figura 28).

Los microsatélites L13 y L47 fueron los marcadores que mostraron polimorfismos (Figuras 29 y 30), para los cual se utilizaron un total de 333 especímenes de *R. ecuadoriensis* que pertenecían a los ambientes sinantrópico y silvestre de las dos provincias (Anexo 23). El microsatélite L13 mostró tamaños de alelos entre 160-174 bp, con un total de 8 alelos en las dos regiones. Cinco clases de alelos fueron registrados en Loja 5 (160, 162, 164, 166 y 172); mientras que en Manabí 8 clases alélicas fueron calculadas (160, 162, 164, 166, 170, 172 y 174). El microsatélite L47 presentó alelos en un rango de 110 a 120 pb, con un total de 6 alelos en las dos provincias. En Loja se observó 3 alelos (114, 116 y 118); mientras que en Manabí fueron registrados seis clases aleléticas (110, 112, 114, 116, 118 y 120) (Tabla 23, Figura 29).

La Figura 31 nos indica las frecuencias alélicas que se calcularon para cada locus. En el L13, alelo con mayor frecuencia fue el de 164 pb en la provincia de Loja, mientras que en la de Manabí fue el alelo 162 pb. El locus L47 el alelo con mayor frecuencia fue con 118 pb en Loja y 114 pb en Manabí.

Las frecuencias alélicas de estos dos locus, por hábitat y por provincia se muestran en las Figuras 32, 33, 34 y 35. En la provincia de Loja, la frecuencia alélica en el Locus L13, el alelo 164 pb es que se presenta con la más alta frecuencia, tanto en el domicilio (DL), como en el peridomicilio (PL) y silvestre (SL); este alelo se representó en un porcentaje de 67%, 73%, y 77% (Figura 33A, B y C). En Manabí, el alelo con mayor frecuencia fue el 162 pb (27%) en el ambiente domiciliario (Figura 33A); y si comparamos entre hábitats, por ejemplo, ninguna muestra presentó el alelo 170 en el domicilio, el alelo 164 presenta un 45% en el peridomicilio (Figura 33B), y en la parte silvestre el alelo 166 fue el que mayor porcentaje presentó, representado en un 34 % (Figura 33C).

En Loja el microsatélite L47, registró solo 3 alelos que son el 114, 116 y 118; el alelo 112 se presentó en el hábitat silvestre. En esta provincia, se observa una alta frecuencia del alelo 118 en los tres hábitats (DL = 79%, PL = 85% y SL = 74%) (Figura 34A, Figura 34B y Figura 34C). En el caso de Manabí, los hábitats del peridomicilio y silvestre el alelo 118 fue el más común (PM = 35%, y SM = 40%) (Figura 35 B y C), mientras que en el domicilio de Manabí el alelo más común fue el 114 (55%) (Figura 35A). Ningún alelo privado se registró en este estudio.

5.7.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL

Con el total de 333 especímenes se realizó el análisis de la estructura poblacional de *R. ecuadoriensis* de Loja y Manabí. Se obtuvo un set de datos de 14 alelos para los 2 loci (L13 y L47) y se excluyeron datos de individuos que no presentaron ningún producto de PCR al realizar el genotipaje. Las muestras con las que no se contó para realizar este análisis fueron $n = 13$ para el L13, y $n = 11$ para el L47; que representan 3,90% y 3,30% respectivamente.

5.7.3. ÍNDICE DE HETEROCIGOCIDAD – EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG (EHW)

Hardy-Weinberg (HWE), nos ayudó a entender si las poblaciones se encuentran en equilibrio o no ($H_o = H_e$); se observó que las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Loja y Manabí mostraron diferencias significativas $p < 0.001$.

Después de realizar la corrección de Bonferroni, HWE, nos muestra que el locus L47 mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) en el peridomicilio y silvestre de Loja y en el peridomicilio de Manabí, pero ninguna diferencia significativa $p > 0.05$ se encontró en el ambiente domiciliar en ambas regiones, como también en el ambiente silvestre de la provincia de Manabí (Tabla 24). Estas diferencias se calcularon entre la heterocigocidad esperada y observada, las cuales indica que existe un déficit de individuos heterocigotos en las poblaciones analizadas.

El microsatélite L13, mostró diferencias significativas en los tres hábitats de Loja ($p < 0.001$); como también en el peridomicilio y silvestre de Manabí. El ambiente domiciliar no presentó diferencias significativas $p > 0.05$.

Adicionalmente, en la Tabla 24 nos muestra que en el microsatélite L13 se observa un rango de Heterocigocidad esperada (H_e) de 0.4 - 0.8 y una heterocigocidad observada (H_o) de 0.2 - 0.5; el microsatellite L47 presenta un rango de H_o 0.3 - 0.8 y un H_e 0.3-0.8.

5.7.4. INDICE DE FIJACIÓN (F_{ST})

El índice de fijación (F_{ST}) fue calculado por medio de la prueba genética de Nei (1973). Se presentaron en el L13 un 7,8% y en el L47 un 6,6% de alelos nulos, estos puede ser un problema si solo tenemos dos loci polimórficos. Los alelos nulos son considerados una vez que han sido probados por tres veces y nos se amplificaron para un locus específico. Solo un espécimen no se amplificó para los dos locus. Este índice fue calculado a diferentes niveles: (i) a nivel de loci, (ii) a nivel de provincia (Loja y Manabí) y finalmente (iii) a nivel de micro ambiente o hábitat.

El valor de F_{ST} generado por los dos locus juntos es de $F_{ST} = 0,191$ para las dos poblaciones, y por cada locus L13 el $F_{ST} = 0,111$; mientras que para el L47 el $F_{ST} = 0,163$, demostrando que existe una diferenciación genética no muy marcada entre los especímenes de *R. ecuadoriensis* de Loja y Manabí $F_{ST} < 1$. El índice de fijación F_{ST} calculado para *R. ecuadoriensis* de los diferentes hábitats [domicilio, peridomicilio (sinantrópicos) y silvestre)] entre Loja y Manabí, nos indicó que existe diferenciación genética. En Loja, observamos que los del Domicilio Loja (DL) con el Domicilio Manabí (DM) muestran un

$F_{ST} = 0,178$, y si comparamos entre el Domicilio de Loja (DL) con el peridomicilio de Manabí (PM) el $F_{ST} = 0,070$. El F_{ST} obtenido entre la comparación del especímenes del hábitat silvestre de las dos provincias SL y SM, presentaron una diferenciación $F_{ST} = 0,107$ (Tabla 25).

Si analizamos por separado no se encontraron diferencias en la estructura poblacional $F_{ST} < 1$. En Loja, los valores obtenidos mostraron poca o ninguna diferenciación genética ($F_{ST} = 0.000-0.008$), es decir, se encontró una similaridad genética entre los especímenes de los tres hábitats, indicándonos un flujo entre los mismos ($p < 0,01$). En la provincia de Manabí también se observa una similaridad entre los especímenes de los tres hábitats; ya que su valor oscila ($F_{ST} = 0.000 - 0.046$) especialmente entre los especímenes del ambiente domiciliario con el silvestre, esto puede deberse ya que los individuos colectados en el domicilio, no fueron precisamente de éste ambiente, sino que fueron colectados en la noche, por los moradores de las comunidades, estos especímenes llegaron atraídos por la luz, visitan, se alimentan y salen a buscar refugio en otro lugar (Tabla 25). El Número de migrantes para el L13 fue de $N_m = 1,99$; mientras que para el locus L47, el $N_m = 1,28$.

En la Figura 36, el análisis de Coordenadas Principales (PCoA) nos muestra una separación entre las dos poblaciones de las dos regiones, y al analizar en subpoblaciones, nos muestra que no hay una separación, indicándonos nuevamente que si existe flujo entre sus subpoblaciones.

5.7.5. ÍNDICE DE ENDOGAMIA (F_{IS})

El índice utilizado para cuantificar la heterocigocidad de la población fue el índice de endogamia (F_{IS}). Este índice presentó un valor promedio entre las dos poblaciones de $F_{IS} = 0.28$ sobre los dos locus polimórficos, el cual indica que existe un cierto grado de diferenciación genética entre los especímenes de las poblaciones estudiadas. Si separamos por locus, el L13 presentó un $F_{IS} = 0,483$; y el L47 un $F_{IS} = 0,081$. En la mayoría de las subpoblaciones el H_o es $< H_e$, lo que se interpretaría como que en estas subpoblaciones se produjeron más apareamientos endogámicos que por azar.

5.7.6. ANÁLISIS DE LA VARIANCIA MOLECULAR (AMOVA)

Para determinar la variación molecular entre poblaciones y subpoblaciones, se utilizó el Análisis de la Variancia Molecular (AMOVA). Este análisis estadístico permitió medir la variación genética entre clases jerárquicas como regiones, poblaciones y subpoblaciones (Freeland, 2005). En la Figura 37 se observó un 1 % de variación entre subpoblaciones (hábitats) dentro de las regiones, indicándonos que no existe variación; Un 18 % de variación genética entre regiones (Loja y Manabí); pero la mayor variación genética encontramos dentro las poblaciones, es decir entre individuos (81 %) (Tabla 26).

5.7.7. EFECTO DE AISLAMIENTO GENÉTICO POR DISTANCIA EN LAS PROVINCIAS DE MANABÍ Y LOJA

El grado de correlación entre la matriz de distancias genéticas (D_{AS}) y la matriz de distancias geográficas fue medido con la prueba de Mantel (Urban, 2003) en el programa GenAlEx v.6.0 (Peakall y Smouse, 2006). En la provincia de Manabí, no se observó una correlación significativa entre la matriz genética y de distancias ($R_{xy} = 0.025$, $p < 0.001$) entre los individuos de las diferentes localidades analizadas. El R_{xy} al ser muy bajo, sugiere que no existe una correlación entre las matrices de distancias genéticas (D_{AS}) y distancias geográficas, a pesar de tener un valor de p altamente significativo generado por el número de datos (Figura 38). Esta falta de correlación entre las matrices fue corroborada con una regresión, realizada entre las distancias geográficas en km y los valores del F_{ST} . Adicionalmente, se realizó un análisis de Coordenadas Principales (PCoA) (Figura 39), el que nos muestra una separación que no existe una separación entre comunidades en esta provincia, indicándonos que si existe flujo entre ellas.

En la provincia de Loja se observó una estructuración espacial relacionada con la distancia ($R_{xy} = 0.175$, $p = 0.001$) entre los individuos de las diferentes localidades analizadas (Figura 40). En la Figura 41, el análisis de Coordenadas Principales (PCoA) mostró agrupamiento de especímenes de *R. ecuadoriensis*, sin embargo, no son muy claros, ya que solamente se trabajó con dos microsatélites.

6. DISCUSIÓN

La Enfermedad de Chagas es aún uno de los problemas más graves de salud pública en América Latina, y a pesar de que uno de los objetivos de la Organización Mundial de la Salud (OPS), ha sido interrumpir la transmisión de esta enfermedad para el 2010 (OPS/OMS, 2004), esto no ha sucedido. Las razones pueden ser, desde la falta de conocimiento a nivel biológico, ecológico (por la situación de complejidad epidemiológica propiamente dicha y hasta la inestabilidad política en la región. Si bien la transmisión ha sido controlada en varios países, en especial en América del Sur (cono sur), ésta no ha tenido el éxito esperado en el norte de ésta región como en Centroamérica. Sin embargo, avances significativos han sido realizados, como la implementación de programas de control y tamizaje de sangre de donantes.

Los esfuerzos por reducir la transmisión de *T. cruzi* a las personas en el Ecuador han sido incompletos ya que solo cubren algunas de las zonas donde existe transmisión o dónde los índices de infestación han sido extremadamente altos hace un tiempo; o han permanecido discontinuos (con acciones puntuales separadas por largos períodos de inactividad). En el país, las estimaciones de indicadores entomo-eco-epidemiológicos, como también la falta de un programa organizado de control y vigilancia sistemática, han sido algunas de las situaciones que se deben tomar en cuenta como cruciales y emergentes.

Los programas de control deberían enfocarse en la planificación de estrategias ejecutables y eficientes al momento de ser utilizadas. Estas deben adaptarse a la situación entomológica (presencia/ausencia de vectores) en cada zona geográfica, así como también

en la ecología, hábitos y capacidad vectorial de cada especie o población, para así poder definir objetivos, implementar intervenciones y evaluar resultados (WHO, 2002).

En el caso de Loja y Manabí, se debe considerar las características propias de las regiones presentes en estas provincias. Para programar un sistema de vigilancia y control de la ECh, se debe considerar que el problema de re-infestación podría darse debido a: (i) focos residuales, (ii) inadecuado procedimiento de rociamiento, (iii) re-infestación de las Unidades Domiciliarias (UDs) por parte de los triatominos silvestres (ya sea por invasión activa desde los ambientes silvestres a los ambientes humanos o por medio transporte pasivo (seres humanos y otros animales) desde otras comunidades que presentan infestación por triatominos).

Rhodnius ecuadoriensis es una especie endémica del occidente ecuatoriano, existen poblaciones silvestres en las dos provincias estudiadas (Loja y Manabí). Estas poblaciones se asocian, como casi todas las especies de *Rhodnius*, a palmeras, siendo en nuestro país la palma de tagua o cade, *Phytelephas aequatorialis* (Abad-Franch et al., 2001b; Suarez-Davalos et al., 2010) y también estas poblaciones pueden estar asociadas a la ardilla *Sciurus stramineus*, tanto en Manabí (Suarez-Davalos et al., 2010) como en Loja (Grijalva y Villacís, 2009) y al ave *Campylorhynchus fasciatus* conocida como “turrenga” en la Provincia de Manabí (Suarez-Davalos et al., 2010), “charrascos” en Guayas (Grijalva et al., 2010) y “sukaca” en Loja (Grijalva y Villacís, 2009).

Abundante presencia de esta especie de triatomo se ha observado en el peridomicilio asociado principalmente a nidos de gallina contruidos con las hojas de plátano o palma seca; y en menor cantidad se observa en el domicilio, dependiendo del tipo

de vivienda y presencia de animales (Grijalva *et al.*, 2005a; Black *et al.*, 2007; Black *et al.*, 2009; Grijalva *et al.*, datos no publicados).

Con la realización de este trabajo se consiguió primeramente conocer, describir y comparar el fenotipo (antenas y alas) y genotipo (mt cytb y microsatélites) de poblaciones de *Rhodnius ecuadoriensis* de las provincias de Loja y Manabí. Villacís *et al.*, (2008) demostró que esta especie es un insecto transmisor de importancia epidemiológica que debe ser tomado en cuenta para definir, planificar, y diseñar programas de Control y Vigilancia eco-epidemiológicas de la ECh en las zonas estudiadas, considerando las características propias de cada una de ellas.

6.1. ÍNDICES ENTOMOLÓGICOS EN LAS COMUNIDADES ESCOGIDAS EN LA PROVINCIA LOJA

Los resultados de este estudio, nos indican que esta especie se encuentra adaptada a los tres hábitats [sintrópico (domicilio-peridomicilio) y silvestre]; y no sólo a los ambientes sinantrópicos como se creía anteriormente (Abad-Franch *et al.*, 2001b; 2002; Cuba-Cuba *et al.*, 2002).

Los resultados de los indicadores entomológicos en la provincia de Loja a nivel sinantrópico fueron de una infestación del $I_{In} = 14,7\%$, y de colonización $IC = 87,8\%$. El $ID = 8,2$ representa 8 especímenes colectados por casa examinada de las 505 UD's y el $IH = 56,3$, que indica que 56 especímenes de esta especie fueron encontrados por casa infestada ($n = 74$ UD's), lo que sugiere que en esta provincia existen colonias en reproducción, o que hay re-infestación de las UD's por parte de los triatominos silvestres, ya sea por invasión

activa desde los ambientes silvestres a los ambientes humanos o puede ser porque existen triatominos residuales debido al inadecuado procedimiento de rociado.

Estudios de Grijalva *et al.*, (2005a) y Black *et al.*, (2007) demostraron que la presencia de esta especie está relacionada con ciertos factores de riesgo en el domicilio; en este estudio se obtuvo un $I_{In} = 6,5\%$, si bien, en este estudio no se realizó análisis de correlación con factores de riesgos como el tipo de construcción de la vivienda (techo de teja, paredes de adobe y piso de tierra), y la presencia de cuyes dentro de la misma, se pensaría que estos factores fomentaría la presencia de estos insectos vectores en el interior de la misma. Lo mismo ocurriría con la acumulación de leña y madera y la presencia de gallinas en el peridomicilio, que sugieren una alta correlación con los índices de infestación altos (+ 5%) según Black *et al.*, (2007) y (2009), lo cual concuerda por su elevado $I_{In} = 10,1\%$ en el peridomicilio en este estudio. Los cantones con mayores porcentajes de infestación fueron Quilanga y Paltas, que son algunos de los cantones más pobres de la provincia (INEC, 2011) concordando la relación de presencia/ausencia de triatominos con el nivel socio-económico de las comunidades.

Estudios por Abad-Franch *et al.*, (2001) y (2002), demostraron que *R. ecuadoriensis* se encontraba asociado netamente a la palma de cade o tagua, *Phytelephas aequatorialis*, sin embargo, la distribución de esta palma va disminuyendo hacia el sur del país, siendo menos frecuente en la provincia del Oro y ausente en los valles interandinos de la provincia de Loja (Cuba-Cuba *et al.*, 2002), donde la vegetación cambia a bosque seco. Entonces, cómo se explica la presencia de este vector en ambientes silvestres en esta provincia?

Estudios de Grijalva y Villacís (2009), observaron que *R. ecuadoriensis* se encontró en Loja, asociada a nidos de ardillas (*Sciurus stramineus*), de ratas (*Rattus rattus*) y de aves (*Campylorhynchus fasciatus*), conocidas como “sukaca” (Grijalva *et al.*, 2010; Suarez-Davalos *et al.*, 2010). En el ambiente silvestre de Loja, los indicadores entomológicos fueron IIn = 13,1%; ID = 1,3; IH = 10,1 y IC = 92,1%; lo que nos demuestra que el control en esta provincia no será tarea fácil mientras existan especímenes silvestres llegando a las unidades domiciliarias (UDs), invadiendo y colonizando. Las campañas de rociamiento no son suficientes; programas de vigilancia masivos con los líderes comunitarios son necesarios para una adecuada y sistemática intervención.

Los índices de (i) infestación en el ambiente sinantrópico (IIn= 14,7%), y (ii) colonización (IC= 87,8%) son consistentes con reportes de seropositividad del 7.1% anti-*T. cruzi* en niños menores a 10 años de edad en esta provincia, sugiriendo que existe una continua transmisión de esta enfermedad en la región (Black *et al.*, 2009). Esto también coincide con estudios previos realizados en esta provincia por Grijalva *et al.*, (2005a) y Black *et al.*, (2007) que registraron una seroprevalencia del 3.9% y 3.6% respectivamente.

En Loja, *R. ecuadoriensis*, es una especie que se ve claramente distribuida en zonas ecológicas debajo de los 1.800 msnm, mientras que otra especie como *Triatoma carrioni* puede distribuirse hasta los 2.200 msnm, pudiendo existir un solapamiento entre especies. Este factor, se debe tener en cuenta para realizar un monitoreo, evaluación y control en esta provincia. Por este motivo, *R. ecuadoriensis*, ha sido considerada como vector primario en Loja, por su capacidad de adaptación y colonización en los tres diferentes hábitats: domicilio, peridomicilio y silvestres, sin embargo, no se puede dejar de tomar en cuenta la importancia epidemiológica de estas especies, *T. carrioni* y *Panstrongylus chinai*, como

vectores secundarios que podrían ir desplazando a *R. ecuadoriensis* y ocupar los ambientes sinantrópicos (Grijalva *et al.*, datos no publicados).

Estudios por Ocaña *et al.*, 2010 han encontrado que los triatominos en esta región presentaron infecciones mixtas de *T. cruzi* y *T. rangeli* en especial en *R. ecuadoriensis*. Si bien *T. rangeli* no transmite la ECh, la presencia del parásito en el torrente sanguíneo puede constituir un elemento que confunde los estudios epidemiológicos (De Moraes *et al.*, 2008).

Con todos estos datos y conociendo la situación y características socio-económicas y ecológicas como: tipo de vivienda, vectores y otros factores de riesgo, es importante reconocer que estas particularidades son compartidas con el país vecino, Perú, y que cualquier programa de control y vigilancia que se diseñe debería ser compartido y ampliado hasta ese país (Cuba-Cuba *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2007). La presencia de vectores y la ECh no reconoce límites entre países.

6.2. ÍNDICES ENTOMOLÓGICOS EN LAS COMUNIDADES ESCOGIDAS EN LA PROVINCIA MANABÍ

Según Grijalva *et al.*, (2011), en su estudio demostró que el tipo de construcción de la vivienda como: pared de caña guadúa (*Guadua angustifolia*), techo de zinc y/o hoja de palma; y piso de caña guadúa (*Guadua angustifolia*) y/o madera rústica no brinda refugio, ni favorece a la presencia de triatominos en el intradomicilio, descartándose estas características como factores de riesgo para la presencia de esta especie dentro del intradomicilio. Esto se corroboraría con los resultados obtenidos en este estudio, por la

baja densidad ($ID = 0,2$) y hacinamiento de *R. ecuadoriensis* ($IH = 3,4$) en el intradomicilio.

En el peridomicilio, algunos factores de riesgo, como la acumulación de ladrillos, piedras y productos agrícolas, permiten la presencia de mamíferos oportunistas (hospederos) que favorecen a la existencia y persistencia de triatominos como *R. ecuadoriensis* (Black *et al.*, 2007; 2009; Grijalva *et al.*, 2011). Si bien en este estudio no se realizó un análisis de correlación de presencia de triatominos vs. factores de riesgo, el alto porcentaje en los índices de infestación en este hábitat $IIn = 13,7\%$, al igual que los valores de densidad ($ID = 6,2\%$) y hacinamiento ($IH = 45,2\%$) en este ambiente, nos indica que debemos tomar en cuenta estos factores de riesgo para una adecuada vigilancia eco-entomo-epidemiológica en esta provincia. Las condiciones mismas del domicilio (estructura de la vivienda) y peridomicilio (acumulación de materiales) dificultan un control adecuado con campañas de rociamiento. Estudios por Grijalva *et al.*, (2011) demostraron que el efecto del insecticida podría verse afectado debido a que en las estructuras peridomiciliares la aplicación no es uniforme y el efecto de residualidad del insecticida varía al estar influenciado por agentes climáticos [temperatura (23 ± 3 °C) y humedad relativa que oscila entre 90 y 97% HR)] (Suárez *et al.*, 2010) así como también la heterogeneidad de este ambiente y disponibilidad de refugios (Gütler, 1999; Cecere *et al.*, 2006).

El elevado $IIn = 22,2\%$ en el ambiente silvestre, demuestra que existe una alta probabilidad de re-invasión desde los ambientes silvestres hasta el peridomicilio, combinado con la posibilidad de la existencia de poblaciones re-emergentes de poblaciones residuales de triatominos, siendo los responsables de mantener una infestación elevada en esta provincia. Adicionalmente, se debe considerar no solo el constante flujo entre

poblaciones de *R. ecuadoriensis* desde el área silvestre hacia el peridomicilio (Villacís *et al.*, 2010), sino también los altos índices de infección por parte de *T. cruzi* (Ocaña *et al.*, 2010) en *R. ecuadoriensis* y el número de personas seropositivas que presenta la enfermedad. La seroprevalencia reportada en esta provincia fue de 1.2%, que representa ~ 17,790 personas infectadas (Yadón *et al.*, 2006; Black *et al.*, 2009). Registros por Aguilar *et al.*, 1999 y Prado, (jefe del PNCh, comunicación personal), indican que esta provincia es una zona de alto endemismo para la ECh. Por este motivo, debe ser tomada en cuenta como un área prioritaria para el control de la transmisión vectorial.

Rhodnius ecuadoriensis en esta provincia ha sido considerado como especie secundaria después de *Triatoma dimidiata* (especie introducida), y es frecuente que estas especies secundarias permanezcan en sus hábitats silvestres hasta que los vectores primarios sean eliminados por las acciones de control. En ese momento, la competencia por los ambientes humanos disminuye y los vectores secundarios tienden a ocuparlos. Estos resultados, al igual que otros estudios indican que la eliminación de vectores primarios puede, si las acciones carecen de continuidad, agravar la situación epidemiológica a medio y largo plazo (Gürtler, 1999; De Souza *et al.*, 2008; Moncayo y Silveria, 2009). En este caso, la presencia de poblaciones silvestres y las elevadas densidades de *R. ecuadoriensis* en ambientes peridomiciliares han dificultando su control con tratamiento químico (Grijalva *et al.*, 2011) en el ambiente sinantrópico, y han tenido un efecto insignificante en la eliminación de poblaciones de vectores que presentan este tipo de comportamiento.

En el hábitat silvestre, la presencia de numerosos animales hospederos y la alta densidad de vegetación favorecen la presencia de *R. ecuadoriensis* sin la necesidad de

colonizar los ambientes domiciliarios y alimentarse de sangre humana. Los elevados índices de colonización (IC) en los ambientes peridomiciliar (86,4%) y silvestre (87,5%) y el bajo IC en el hábitat domiciliar (4,3%), sugieren que esta especie solo llega a visitar las viviendas, más no a colonizarlas, vuela atraída por la luz (foco) durante la noche, se alimenta y sale, ya que al no encontrar refugio dentro de las mismas, vuela en busca de otro lugar para esconderse.

La existencia de poblaciones de triatominos silvestres asociadas a palmas *Phytelephas aequatorialis*, y *Aiphanes eggersii*, como también a nidos de mamíferos como ardilla, *Sciurus stramineus*, y ratón, *Mus musculus* (Suarez-Davalos *et al.*, 2010; Villacís *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2011) y a nidos de aves, *Campylorhynchus fasciatus* (Suarez-Davalos *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2010), nos lleva a pensar en la capacidad adaptativa de la especie, que le permite colonizar eficientemente diferentes hábitats, especialmente el peridomiciliar y el silvestre.

Estudios realizados por Terán en 2010, demostraron que la abundancia de *R. ecuadoriensis* en Manabí es cíclica, es decir, que la densidad de esta especie depende de algunas condiciones microambientales como: (i) la presencia de cultivo (tiempo de floración y fructificación), (ii) la estacionalidad (invierno-verano), la misma que favorecerá a la proliferación de hospederos. (iii) la temperatura y (iv) humedad, que juegan también un rol importante en la presencia de este vector. Al conocer, la abundancia, frecuencia, y comportamiento de *R. ecuadoriensis* se puede comenzar a considerar a esta especie como vector primario de atención en esta provincia (Grijalva *et al.*, 2011), y ya no secundaria detrás de *T. dimidiata* como se pensaba anteriormente (Abad-Franch *et al.*, 2001b).

En los Triatominae, es frecuente observar que poblaciones de la misma especie que ocupan distintas áreas geográficas presenten diferencias en la expresión fenotípica, ligada o

no a diferencias genéticas, permitiendo interpretar rutas de dispersión y aislamiento poblacional (Catalá *et al.*, 2005, Abrahan *et al.*, 2008, Hernández *et al.*, 2008, Dujardin *et al.*, 2009, Schofield y Galvão 2009; Hernández *et al.*, 2011). Algunas especies tienen un rango ecológico estrecho y solo ocupan hábitats específicos, por lo cual, tienen baja importancia en la transmisión de *T. cruzi* al ser humano, a menos que, su preferencia sea en su mayoría los hábitats domiciliarios, como en el caso de *Triatoma infestans* (Catalá *et al.*, 2005, Catalá y Dujardin *et al.*, 2007, Hernández *et al.*, 2008, Abrahan *et al.*, 2008).

Antecedentes descritos acerca de las poblaciones del género de *Rhodnius* como *R. colombiensis* y *R. pallescens*, especies hermanas de *R. ecuadoriensis* (complejo *pallescens*) en otros países como Colombia y Venezuela, nos llevan a preguntarnos si el flujo y re-infestación de viviendas por *Rhodnius ecuadoriensis* en el centro y sur del país, está determinada por dinámicas comparables a la de estas especies. Una manera de poner a prueba la hipótesis relacionada con el proceso de diferenciación y flujo entre poblaciones ha sido mediante el análisis de (i) fenotipo antenal, (ii) morfometría geométrica alar y (iii) estructura genética (mt Cyt b) y (microsatélites) de sus poblaciones, y subpoblaciones [poblaciones sinantrópicas (domicilio y peridomicilio) vs. poblaciones silvestres].

6.3. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE *R. ecuadoriensis*

Los estudios de morfometría geométrica alar, han sido utilizados para fines taxonómicos y diferenciación sexual en las distintas especies de triatomíneos (Matias *et al.*, 2001, Villegas *et al.*, 2002), y también han permitido conocer la estructuración espacial de poblaciones en distintos hábitats (Gumiel *et al.*, 2003; Schachter-Broide *et al.*, 2004; Feliciangeli *et al.*, 2007; Riaño *et al.*, 2009; Dujardin *et al.*, 2009). Por su parte, ha sido

demostrado que el fenotipo antenal (tipo y número de sensilla presentes en las antenas) es útil para diferenciar géneros, especies y sexo en los Triatominos (Catalá y Schofield 1994, Catalá, 1997, Gracco y Catalá 2000, Carbajal de la Fuente y Catalá 2002, Catalá *et al.*, 2005, Moreno *et al.*, 2005, Catalá y Dujardin 2007, Carbajal de la Fuente *et al.*, 2008; Villacís *et al.*, 2010). También es posible usar estos marcadores fenotípicos para la caracterización de poblaciones de una misma especie que viven en diferentes hábitats, como ha sido probado para los principales transmisores de la enfermedad de Chagas, *Triatoma infestans* (Catalá y Dujardin 2001; Hernández *et al.*, 2008, Abrahan *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2011), *Triatoma dimidiata* (Catalá *et al.*, 2005, Arroyo *et al.*, 2006), *Panstrongylus megistus* (Villela *et al.*, 2005) y *Rhodnius prolixus* (Esteban *et al.*, 2006; Márquez *et al.*, 2011).

Los resultados de este estudio muestran que el tamaño y conformación alar y el fenotipo antenal, diferencian claramente las dos poblaciones geográficas de *R. ecuadoriensis* de Loja y Manabí; y brindan soporte a la hipótesis de ausencia de intercambio de especímenes entre estas dos regiones.

6.3.1. FENOTIPO ANTENAL

La separación entre las poblaciones de *R. ecuadoriensis* va de la mano con los resultados de las diferencias en el largo del cuerpo, en los patrones de comportamiento del ciclo de vida y hábitos de alimentación y defecación de esta misma especie entre los dos provincias (Villacís *et al.*, 2008), al igual que los resultados en cuanto a las diferencias genéticas de *R. ecuadoriensis* obtenidos por Abad-Franch y Monteiro, 2005.

De acuerdo a los estudios de Villacís *et al.*, 2008, sobre los hábitos de alimentación y defecación, *R. ecuadoriensis* es considerado como un vector eficiente de *T. cruzi*. La defecación post prandial comienza tempranamente con los individuos de *R. ecuadoriensis* de Manabí, en los cuales la competencia vectorial sería mayor que en los de Loja.

Según Catalá y Dujadin, (2007) y Hernández *et al.*, (2011) estudios en *Triatoma infestans* mencionan que las características del hábitat (micro-ambientes) donde se desarrollan los triatomíneos pueden direccionar expresiones fenotípicas específicas en los adultos, ejerciendo una presión selectiva del hábitat sobre el fenotipo antenal, esto se comprueba especialmente en hembras de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Loja. La separación neta de los individuos capturados en el ambiente sinantrópico (domiciliar – peridomiciliar fue de $p < 0.01$), y la gran similitud de ambos con los insectos silvestres, sugieren un pool fenotípico muy variado en el área silvestre, que permite la adaptación a otros hábitats. Parecería que cada uno de los hábitats seleccionaría un fenotipo exclusivo y explicaría una mayor ventaja de domiciliación en las poblaciones de Loja, que no se observan en Manabí.

Las diferencias en los fenotipos antenales de *R. ecuadoriensis* entre el peri e intradomicilio en Loja probablemente se deben a los hospederos de los que se alimentan [aves (*Gallus gallus*, *Columba livia*) y mamíferos (*Canis lupus*, *Rattus rattus*, *Mus musculus*)] y parece indicar un bajo o nulo intercambio de hembras entre estos dos hábitats. Por el contrario, la mayor similitud fenotípica de los machos, en los distintos hábitats indicaría que mantienen un importante flujo entre el ambiente silvestre y el domiciliar.

Por otro lado, el dimorfismo sexual en el fenotipo antenal es raro encontrar en especies de la tribu Rhodniini, aunque si es más común en especies de los Triatomini (Catalá 1997; Carbajal de la Fuente y Catalá 2002; Moreno *et al.*, 2005; Esteban *et al.*, 2006), en este estudio de *R. ecuadoriensis* se observa que solo en el hábitat intradomiciliar en Loja hay diferenciación sexual ($p < 0.006$), esto puede deberse por el tamaño de la muestra ($n = 6$), y lo que se recomienda es que se amplíe este estudio con una mayor cantidad de hembras domiciliarias.

Según Hernández *et al.*, (2008) y (2011), las variaciones a nivel del hábitat y regional de la expresión sexual son una evidencia de la expresión de la diversificación genética que sustenta la capacidad adaptativa de especies, si bien esto se evidenció en *Triatoma infestans*, en *R. ecuadoriensis* se corrobora esta información, la cual se encuentra en mayor grado a nivel domiciliar en extensas áreas del sur del Ecuador (Loja) como también al norte del Perú (Cuba-Cuba *et al.*, 2002), para lo cual debe ser tomado como vector primario de importancia epidemiológica para su monitoreo, lo que no sucede en sitios más húmedos como en la costa central (Manabí), dónde se encuentra mayoritariamente en hábitats silvestres; por esta razón, es necesario investigar más las características propias de cada zona/región donde las poblaciones de vectores exploran cambios fenéticos que hacen posible la domiciliación.

El nivel de intercambio entre las poblaciones dependerá de las diferencias fenotípicas que la selección local (hábitats) pueda influenciar sobre las mismas. Efectos de la migración, como también de asimilación o acomodación genética pueden actuar progresivamente en la inducción de cambios genéticos reales. La selección indirecta sobre los fenotipos puede atraer y favorecer a ciertos genotipos, donde muchos individuos

presentan el fenotipo adaptado a cierto ambiente por razones fisiológicas o genéticas (Dujardin *et al.*, 2009).

En cuanto al complejo *pallescens*, las especies de *R. pallescens* y *R. colombiensis*, se reportaron en un inicio asociadas con palmeras, particularmente a la palma del género *Attalea butyracea*, *Coccus nucifera*, *Jessenea batava*, y *Elaeis oleifera* (Moreno *et al.*, 1999; Jaramillo, 1999), y *R. ecuadoriensis* asociada con la palma de cade o tagua, *P. aequatorialis*, sin embargo, hay evidencias de una incipiente domiciliación por parte de *R. pallescens* (Sousa y Saldaña, 1994). Lo que no se observa con *R. ecuadoriensis*, que está adaptada al domicilio tanto al sur del Ecuador (Abad-Franch *et al.*, 2001b; Grijalva *et al.*, datos no publicados) como al norte del Perú (Cuba-Cuba *et al.*, 2002).

La relación de *R. ecuadoriensis* con las dos especies consideradas más próximas o hermanas se comprobó mediante análisis del fenotipo antenal, además de que se demostró que son tres especies diferentes. *R. ecuadoriensis* se encuentra más emparentada con *R. pallescens*, sin embargo, este análisis no concuerda con estudios de Monteiro *et al.*, (2000) del gene mitocondrial (mt Cytb), donde se demuestra que *R. ecuadoriensis* se encuentra más próxima con *R. colombiensis*, separada de *R. pallescens*, pero dentro de un mismo complejo. No obstante, dado el escaso número de individuos disponibles para las últimas dos especies, se recomienda nuevos estudios, incorporando incluso investigaciones a nivel de genotipo en hembras como también del fenotipo y genotipo de machos de este complejo. Sin embargo, el fenotipo general de *R. ecuadoriensis* obtenido en este trabajo, concuerda con las observaciones en Microscopía electrónica de barrido sobre el fenotipo antenal de esta especie (Catalá y Schofield 1994).

6.3.2. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA ALAR DE *R. ecuadoriensis*

La diferencia en el tamaño alar de especímenes de *R. ecuadoriensis*, se relaciona con el largo del cuerpo (Villacís *et al.*, 2008), los especímenes de la provincia de Manabí presentan un mayor tamaño alar ($p < 0.001$), que los especímenes de *R. ecuadoriensis* en la provincia de Loja. Esta variación en el largo del cuerpo generalmente está influenciada por factores del ambiente como la temperatura (regla de Bergmann). La regla de Bergmann (Bergmann, 1847) postula: “que los individuos tienen mayor tamaño cuanto más baja sea la temperatura media del ambiente en que viven”, en este estudio, esta regla no se aplica, ya que la temperatura y humedad más elevadas se presentan en la provincia de Manabí y no en Loja, sin embargo esta regla no es universal, ya que existen otras características que podrían estar influenciando el tamaño del individuo y de las alas de *R. ecuadoriensis* (más grande) en Manabí y (más pequeño) en Loja, como la concentración de oxígeno, la disponibilidad de alimento y cambios ambientales que pueden producir una fuerte presión selectiva en la diversificación rápida a nivel morfológico (Huntley y Webb, 1989); además, algunos organismos como respuestas de estrés a las condiciones ambientales, bajan su rango metabólico, más de lo normal (Gillooly *et al.*, 2001). Sugiriendo que en este estudio, el tamaño del cuerpo y por ende de las alas de *R. ecuadoriensis* aumenta a medida que disminuye la altitud.

La conformación alar de *R. ecuadoriensis*, varía significativamente entre provincias. Según Dujardin *et al.*, (2009) en estudios morfométricos confirmaron que la conformación de una estructura está frecuentemente relacionada con factores genéticos, lo cual en este estudio parece estar demostrándose y lo mismo en el comportamiento que anteriormente se ha observado, sugiriendo un proceso de especiación. Hasta el momento, no se ha encontrado un grupo intermedio entre las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis* que

compartan características de ambas, y que puedan estarse solapando; sin embargo, es necesario realizar más investigación en esta área.

Adicionalmente, estudios de Riaño *et al.*, (2009) muestran que la variable de conformación es frecuentemente influenciada por las variaciones genéticas y que son uno de los caracteres más estables a pesar de la existencia de perturbaciones en el medio ambiente; especímenes de los dos sexos de *R. ecuadoriensis* de los hábitats silvestre y peridomiciliar de Manabí son fenotípicamente similares, sugiriendo un intercambio (flujo) entre los hábitats. Por el contrario, los especímenes de Loja del hábitat silvestre y sinantrópico muestran diferencias significativas en la conformación del ala.

Estudios en *T. infestans* por Catalá, 1997; Catalá *et al.*, (2005); Abrahan *et al.*, (2008) y Dujardin *et al.*, (2009) y en otras especies de Triatominos (Schachter-Broide *et al.*, 2004, Feliciangeli *et al.*, 2007), han investigado la similitud observada en el fenotipo antenal y la morfometría geométrica alar, y han encontrado que esta similitud se atribuye a los requerimientos del hábitat, lo mismo que se ha observado en este estudio con *R. ecuadoriensis*, en donde la similitud observada en el fenotipo antenal como en el tamaño alar de los especímenes silvestre y sinantrópicos (domiciliar - peridomiciliar) de Loja responde a los requerimientos de hábitat, presencia de hospederos e influencia del medio ambiente.

Estudios morfométricos de cabeza y ala como también en el fenotipo antenal en *T. infestans* por Hernández *et al.*, 2011, demostraron diferencias entre distintas zonas, las cuales se encuentran separadas al menos a 80 km entre ellas, sugiriendo efectos del medio ambiente en sus características fenotípicas, con bajo o nulo intercambio de especímenes

entre las mismas, lo mismo que se ha encontrado en este estudio de variabilidad fenotípica de *R. ecuadoriensis*, donde las comunidades en las que se recolectaron de Manabí, quedan distantes a una distancia de ~ 372 Km de las de Loja.

Estudios de Christensen *et al.*, (1981), Jaramillo *et al.*, (2000) y Zeledón *et al.*, (2006), han mostrado que poblaciones silvestres de triatominos son consideradas como formas originales, de las cuáles se derivan los especímenes que habitan en el peridomicilio y domicilio. En este estudio, con el análisis de Disparidad Métrica (DM) en la conformación del ala se demuestra un incremento progresivo desde el hábitat silvestre hacia el hábitat domiciliar en poblaciones de Loja, más no en las de Manabí, y una reducción significativa en la variación de la conformación del ala en los machos de Manabí, sugiere una limitación ecológica en la diversidad del ala que no se observó en los especímenes de Loja. Por otro lado, una alta Disparidad Métrica (DM) en la conformación del ala en hembras de *R. ecuadoriensis* en el hábitat domiciliar de Loja, puede estar relacionado con la variación fenotípica a la tolerancia del hábitat humano, dónde existe una más alta probabilidad de sobrevivir por parte de los vectores, ya que se creería que el hábitat domiciliar es más estable y proporciona una fuente de alimento constante que permitiría la reproducción de esta especie en el intradomicilio, siempre y cuando las condiciones como los factores de riesgo lo fomenten.

Los resultados de los análisis del fenotipo y los estudios previos de la diferencia en el comportamiento (Villacís *et al.*, 2008), sustentan la hipótesis de una selección disruptiva (especiación simpátrica) que actúa sobre las poblaciones de *R. ecuadoriensis*, es decir, que los especímenes de esta especie se han podido adaptar a fuentes de alimentación

(hospederos) que desarrollan mecanismos de aislamiento dentro de una región en ambientes.

6.4. PRIMERA GENERACIÓN (F1) DE *R. ecuadoriensis*.

Los resultados obtenidos a nivel del fenotipo, nos sugirieron que existe diferenciación entre las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis*, y a pesar de que aparentemente no existe flujo entre las mismas (aislamiento geográfico), pudieron cruzarse en laboratorio obteniendo una primera generación (F1), aunque el porcentaje de viabilidad de huevos fue relativamente bajo (32%). Al observar estos resultados, se demuestra que el presentar un 87,5% de efectividad en el cruzamiento, sugiere, que a pesar de que estas poblaciones son grupos de especímenes fértiles, aparentemente aislados reproductivamente, y que se encuentran geográficamente separados, un grupo del otro, tienen un porcentaje de cruzamiento alto.

En los cruces experimentales las hembras de *R. ecuadoriensis* de Manabí presentaron un tiempo de pre-ovoposición promedio de $15,5 \pm 1,5$ días; similar a lo observado en el ciclo reproductivo entre machos y hembras solo de Manabí ($15,5 \pm 0,05$ días). A diferencia de Loja las hembras de *R. ecuadoriensis* en los cruces experimentales mostraron un tiempo de pre-ovoposición promedio de $13,6 \pm 0,08$ días, menor al observado en el ciclo reproductivo de machos y hembras solo de Loja ($16,5 \pm 0,03$ días). Sin mostrar diferencias significativas en el tiempo de pre-ovoposición al comparar los especímenes de los cruces experimentales con los de Manabí $p = 0.991$, ni con los de Loja $p = 0.466$ respectivamente. Según estudios de Ryan, (1985), demostraron que el tiempo de ovoposición, como también el número de huevos por puesta, guarda una correlación positiva con el tamaño de la

madre, lo cual puede proporcionar un mecanismo que explique la tendencia hacia el aumento de tamaño, los individuos más grandes dejarían más individuos. Esta aseveración no concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que el tiempo de pre-ovulación y el número de huevos producidos por las hembras de *R. ecuadoriensis* de Manabí [más grandes ($16,59 \pm 0,32$ mm), pero menos huevos (1.338 huevos viables)] y Loja [más pequeñas ($14,72 \pm 0,39$ mm), y más huevos 1687 huevos viables)].

Resultado de estos cruces, se contabilizaron los huevos puestos a pesar del bajo porcentaje de viabilidad, 32% de huevos, indicándonos que puede existir una interferencia en el desarrollo embrionario (Belisário *et al.*, 2007). El promedio de huevos puesto por hembra fue mucho menor si comparamos con los resultados de esta misma especie en el ciclo reproductivo entre especímenes de *R. ecuadoriensis* de la misma región [86% (Loja) y 79% (Manabí)]. A pesar de la diferencia del porcentaje, observamos que si pueden cruzarse los especímenes de las dos poblaciones. Sin embargo, sería importante realizar réplicas de este experimento para llegar a resultados concluyentes.

Estudios de cruzamiento entre diferentes especies *Triatoma maculata* con *T. pseudomaculata*, especies pertenecientes al “complejo infestans” (Lent y Wygodzinsky, 1979) y/o “complejo maculata” (Carcavallo *et al.*, 2000), y que son consideradas como especies alopátricas, sin oportunidad de intercambio génico y con resultados de viabilidad en una sola dirección (machos de una especie, con hembras de la otra, pero no viceversa), nos demuestran que el porcentaje de viabilidad oscila entre los 72 - 90% (Belisário *et al.*, 2007). El decrecimiento de viabilidad de huevos (32%) en *R. ecuadoriensis* en los cruces experimentales comparado con la viabilidad de huevos en los cruces entre especímenes en una sola provincia (Loja y/o Manabí), podría deberse a varias razones: la primera por

infertilidad ya sea de los machos o de hembras de una zona específica, o puede existir esterilidad del híbrido, donde el híbrido es viable pero estéril o reproductivamente deficiente, y por este motivo, el siguiente avance de conocimiento sobre esta especie es la observación del cruzamiento y viabilidad de los huevos en la segunda generación (F2) de *R. ecuadoriensis*.

Otra de las razones puede deberse a lo que se conoce como mortalidad cigótica o inviabilidad del híbrido, en el cual el huevo es fertilizado pero el cigoto no se desarrolla o produce un individuo de viabilidad reducida, esto pudo haber ocurrido ya que de los 760 huevos puestos, solo 243 fueron viables.

Otras razones se pueden tomar en cuenta para explicar esa baja viabilidad de los huevos, como (i) aislamiento estacional o de hábitat, el cruzamiento entre poblaciones / especies de triatomíneos que crecen en distinto micro-ambiente (domiciliar / peridomiciliar / silvestre), (ii) influencia en los ritos de cortejo de los machos a las hembras, impidiendo el apareamiento, (iii) aislamiento mecánico, en el cual los especímenes intentan aparearse pero no logran la fertilización debido a la distinta conformación de los genitales, sin embargo, este último no es muy frecuente (Carvalho y Barreto 1976; Franca-Rodríguez *et al.*, 1979; Galíndez *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 2005).

Según Downe y Archer (1975), la fuente de alimento es un factor importante en la tasa reproductiva y en el índice de fertilidad. En su estudio se planteó que la sangre de gallina presenta mayor cantidad de nutrientes y ayuda la digestión, y promueve una mejor producción de huevos en los insectos, que la sangre de mamífero (Wigglesworth, 1974; Nayar y Sauerman, 1977). En esta investigación, por facilidad en la manipulación, se

utilizó sangre de ratón (*Mus musculus*). Sin embargo, es necesario realizar estudios de ciclo de vida, tiempo de fertilidad y ovoposición comparando diferentes tipos de fuentes de alimentación (ave vs. mamífero). Cabe recalcar, que de acuerdo a este estudio, y a otros de Grijalva y Villacís, 2009; Suarez-Davalos *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2010, 2011, especímenes de *R. ecuadoriensis* en el peridomicilio se encontraron en su mayoría asociados a nidos de gallinas; y que los especímenes del ambiente silvestre, se relacionaron con nidos de mamíferos (*Sciurus stramineus*, *Rattus rattus*), adicionalmente, la mayor abundancia de esta especie la encontramos asociada a nidos de ave (*Gallus gallus*). Por su parte, estudios de Arévalo *et al.*, (2007) sobre *R. colombiensis* y *R. prolixus* mostraron tasas menores de ovoposición y fertilidad cuando fueron alimentados con sangre de gallina, que con sangre de mamíferos, esto puede deberse, a que los Rhodniini se han encontrado asociados primariamente a una fuente de alimento constituida por mamíferos silvestres, como nidos de raposas (*Didelphis marsupialis*) (Christensen y Vásquez, 1981), ardillas (*Sciurus stramineus*) (Grijalva y Villacís, 2009; Suarez-Davalos *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2011), ratas (*Rattus rattus*) (Suarez-Davalos *et al.*, 2010) y que debido a causas antropogénicas, algunas especies de este género, se han adaptado a diferentes hábitats, como al sinantrópico modificando su hábito de alimentación a otras especies hospederas.

En cuanto al análisis de morfometría de la primera generación (F1), la reducción general del tamaño del cuerpo se ha notado en otras especies, de generación en generación dentro del laboratorio (Belisário *et al.*, 2007). Al cruzar poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Manabí (mayor tamaño alar) con poblaciones de Loja (menor tamaño alar), se esperaba, que el tamaño alar obtenido en los especímenes de la primera generación (F1) se mostrara compartiendo el tamaño entre las dos poblaciones parentales, es decir, se cumplió la

primera ley de Mendel que nos dice: “que al cruzar dos especímenes para un determinado carácter (alas), los descendientes de la primera generación son todos iguales entre sí (igual fenotipo e igual genotipo), e iguales (en fenotipo) a uno de los progenitores”, eso se evidenció al cruzar Manabí (tamaño alar grande – AA); y Loja (tamaño alar pequeño – aa); en la F1 todos salen tamaño intermedio o compartido (Aa). Es, en la segunda ley de Mendel que reaparecen los caracteres recesivos en la segunda generación (F2), en proporción de tres a uno respecto a los caracteres dominantes; y a nivel del genotipo, con el paso del tiempo, las siguientes generaciones presentarían cada vez menos copias de los alelos originales y cada vez los especímenes se volverán más homocigotos, aumentando también la probabilidad de que sus alelos sean idénticos por descendencia (Wright, 1930).

Los conceptos de especie, nos ayudan a clarificar ésta sección del estudio para llegar a conclusiones importantes. Según Dobzhansky (1937) “especie es el grupo natural de individuos que pueden cruzarse entre sí”, pero Mayr (1942) refuta ese concepto, ya que toma en cuenta sucesos de hibridación, en los que se produce descendencia fértil. Las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis* al encontrarse aisladas geográficamente, pueden producir una separación, y por ende, un aislamiento reproductivo; si esto llega a suceder, podría ocurrir un proceso de especiación como producto final, que podría ocurrir no a tan largo plazo.

6.5. ANÁLISIS DEL GENOTIPO DE *R. ecuadoriensis*

Se investigó la estructura genética de *R. ecuadoriensis* como indicador de dispersión, y comprensión de la capacidad de adaptación a las distintas regiones (Loja y Manabí) y también a los diferentes hábitats (domicilio, peridomicilio y silvestre). El comprender la

capacidad de dispersión (flujo) es crucial para la implementación de estrategias de control efectivas. Este es el primer estudio que se realiza para conocer los análisis de genotipo de *R. ecuadoriensis* en dos regiones (Manabí y Loja).

6.5.1. GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO B (mt Cyt b) DE *R. ecuadoriensis*

Las nuevas técnicas para el estudio de secuencias del ADN mitocondrial permiten analizar la diversidad genética de las poblaciones y superponer los árboles o redes obtenidos, con la distribución geográfica (filogeografía) (Pfeiler *et al.*, 2006). De este modo, se estudia la distribución de los haplotipos mitocondriales (variantes del ADN mitocondrial) dentro y entre las poblaciones en relación con la historia de esos haplotipos (Gomez-Palacios *et al.*, 2008).

Los estudios de filogeografía empleando análisis de ADN mitocondrial permiten interpretar la historia evolutiva de las especies y su dispersión, brindando información relevante sobre su rango de expansión, colonización y fragmentación pasada y sobre la estructura de sus poblaciones (Avise, 2000). Asimismo, la presencia de un mismo haplotipo en varias poblaciones es evidencia de su origen común (monofilético). Los resultados obtenidos nos indican que entre estas dos regiones se encontró que solamente el 8.33% de los haplotipos son compartidos (3 haplotipos).

Según Abad-Franch y Monteiro (2005), se encontraron diferencias en las secuencias de ADN mitocondrial de *R. ecuadoriensis* en cinco poblaciones, de las cuales cuatro corresponden a la provincia de Manabí (región de la costa central) del Ecuador y la

población restante corresponde al norte de Perú. Los triatomíneos de Perú presentaron un haplotipo que parece tener un origen divergente. Los autores de este estudio sugirieron que estos dos clados representan filogrupos y/o especies incipientes, lo cual dificulta la planificación de programas de Control en la provincia de Manabí. Si comparamos los resultados anteriormente mencionados con los obtenidos en esta investigación, se observó la presencia de 36 haplotipos, de los cuales, 15 exclusivos para Loja y 18 en Manabí. Tres haplotipos se compartieron entre las poblaciones de las dos regiones (HELM6, HELM9 y HELM13). Se sabe que una población es ancestral o antigua, cuando posee numerosos y muy diferentes haplotipos; y reciente o colonizadora, si tiene uno o unos pocos haplotipos (Avisé et al., 1987; Emerson et al., 2001). Teniendo en cuenta esto se puede inferir que la población de Manabí (18 haplotipos) es más antigua que la de Loja (15 haplotipos), y más aún cuando los 18 haplotipos presentes en Manabí pertenecen a un solo cantón, Portoviejo; mientras que los 15 haplotipos observados en Loja fueron distribuidos en toda la región.

Según el dendrograma, el nodo I (BT = 100%) separa *R. pallescens* de *R. ecuadoriensis*, demostrando así el origen monofilético de *R. ecuadoriensis*. El nodo II con un bootstrap de 79% agrupa a HEL8 y HEM29 del resto de los haplotipos analizados; el haplotipo 8 (HEL8) está conformado solo por especímenes recolectados en las comunidades de la Extensa y El Huayco, cantón Catamayo, provincia de Loja. En este caso, se pensaría que podría llegar a una especiación alopátrica, ya que Catamayo, es un valle fértil, rodeado por montañas, que permite el aislamiento con el resto de cantones. Este cantón, se encuentra bañado por dos ríos, Boqueron y Guayabal; y de acuerdo a su ubicación geográfica, se ha convertido en una ciudad turística, que permite comunicar la provincia de Loja con el resto del país, porque en él se encuentra el Aeropuerto “Camilo Ponce Enriquez”. El haplotipo 8 (HEL8), podrá ser considerado como una metapoblación,

la cual se puede definir como una “población de poblaciones” o una “estructura espacial de poblaciones reproductivas locales, donde la migración entre poblaciones locales tiene efecto en la dinámica a largo plazo, incluyendo la posibilidad de re-establecimiento de poblaciones previamente extintas” (Hanski, 1998). Migraciones, colonizaciones y extinciones son los principales procesos involucrados en el estudio de las metapoblaciones (Hanski, 1998). Numerosos estudios indican que poblaciones pequeñas y aisladas tienen escasas posibilidades de persistir a largo plazo / y son más vulnerables a la extinción que las poblaciones grandes (Thomas, 1994).

El nodo III (BT = 70%) separa al haplotipo HEL4 del resto. El nodo IV (BT = 39%, no significativo) abarcó a los haplotipos de Loja: HEL1, HEL2, HEL3, HEL5, HEL7, HEL10, HEL11, HEL12, HEL14, HEL15, HEL16, HEL17, HEL18; y se observó una estrecha relación con los haplotipos de Manabí HEM21, HEM22, HEM23, HEM26, HEM27, HEM32; adicionalmente, dentro de esta población, se encontró a los tres haplotipos compartidos entre las dos poblaciones: HELM6, HELM9 y HELM13, esto indica, que comparten algunos cambios de secuencia. El nodo V (BT = 45%, no significativo) agrupa a los haplotipos de la provincia de Manabí: HEM19, HEM20, HEM24, HEM25, HEM28, HEM30, HEM31, HEM33, HEM34, HEM35 y HEM36. Aunque los valores bootstrap para las agrupaciones no son estadísticamente significativos (< 65%), se ven las agrupaciones por provincias, por este motivo se procedió a realizar una red de haplotipos para tener una mejor visualización de estos.

Se observó una gran diversidad haplotípica (H_d) total $H_{d\text{TOTAL}} = 0.9313 \pm 0.007$. Los valores obtenidos para el índice de polimorfismo (θ) y diversidad nucleotídica (π) totales fueron de $\theta = 0.01535$ y $\pi = 0.01641 \pm 0.00385$ respectivamente. La diversidad

nucleotídica (π) fue más elevada en la población de Loja que en la de Manabí, mostrando diferencias significativas en la diversidad de nucleótidos. El test de Neutralidad selectiva Tajima's (D), nos ayuda a inferir si una población está decreciendo o incrementándose. El valor para este test en la población de Loja fue de (+) 1.88900, lo que nos sugiere una disminución en el tamaño de la población y/o que la misma presenta una selección en equilibrio, a nivel de haplotipos. En la población de Manabí al ser su valor negativo (-) 0.83680, nos muestra que la población tiene un alto polimorfismo de baja frecuencia, es decir existe variación en las secuencias (mutaciones) pero estas se presentan en bajas frecuencias. Esto nos puede sugerir que la población se encuentra en incremento después de un proceso de colonización (cuello de botella) o un proceso de selección. Al comparar estos resultados con el número de haplotipos presentes en cada región se puede inferir que Manabí con 18 haplotipos en un solo cantón, si se encuentra en crecimiento; mientras que en Loja con 15 haplotipos en toda la provincia, la población presenta una selección en equilibrio. Hay que tener en cuenta, que no hubo igual esfuerzo de muestreo, ya que en Manabí solo se muestreó en el centro de la provincia (cantón Portoviejo), mientras que de Loja, se analizaron especímenes de varios cantones, tratando de abarcar en su totalidad.

El estudio de la estructura de las poblaciones de un organismo nos permite conocer si las poblaciones de una especie en áreas geográficas continuas, pueden o no encontrarse aisladas. Esto se puede observar mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA), donde se calcula la distancia genética, para conocer la existencia de flujo génico entre las poblaciones. Si el valor del F_{ST} es cercano a 0, no existe diferenciación, es decir, las poblaciones presentan flujo génico; y si este valor es 1, no existe flujo entre las dos poblaciones, existiendo diferenciación. En las poblaciones de *R. ecuadoriensis* se observó un número de migrantes (N_m) de 2,24 y un índice de fijación ($F_{ST} = 0.18238$). Nuestros

datos, indican que a nivel genético las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis* (Manabí y Loja) son muy parecidas entre sí; a pesar de encontrarse geográficamente separadas, es decir están aisladas. El número de migrantes, nos ayuda a comprender la existencia de flujo génico entre estas dos poblaciones, a pesar de encontrarse geográficamente separadas, y lo interesante, sería conocer si en la práctica existen intercambios frecuentes de especímenes entre ciertas poblaciones o sub-poblaciones en la naturaleza.

El flujo de los triatominos puede darse de dos maneras: (i) activa (mediante el vuelo de los triatominos); (ii) pasiva (mediante un vehículo, llámese ser humano u otro animal). En los triatominos, al no ser excelentes voladores, se pensaría que el transporte pasivo es la opción más acertada; puede ser que el ser humano se haya transportado de una región a otra llevando consigo algún espécimen o indicios de su presencia (huevos), cómo también, pudo ser que alguien que padece la enfermedad de Chagas, entre en contacto con los triatominos (de la otra región), e ingresa dentro de su ciclo de transmisión. Si estas dos poblaciones (Loja y Manabí) se encontraran diferenciadas o bien separadas, las consecuencias podrían ser muy importantes para las estrategias de control, puesto que debido a un riesgo menor de re-infestación en poblaciones aisladas, estas poblaciones tendrían una probabilidad mayor de permanecer "controladas" después del tratamiento; la invasión de esta especie puede estar irrumpiendo en las viviendas humanas, para luego salir a buscar refugio.

Al realizar el análisis de variación genética entre especímenes de *R. ecuadoriensis* de dos zonas geográficas diferentes (Loja y Manabí), observamos una moderada diferenciación genética entre ellas ($G_{ST} = 0.05460$), sin embargo, a pesar de esta moderada diferenciación y la presencia de tres haplotipos compartidos, se sugiere la existencia de

introgresión (movimiento de genes de una especie/población a otra, consecuencia de un proceso de hibridación seguida por retrocruzamiento) (Monteiro *et al.*, 1999; Mazzoni *et al.*, 2006). No obstante, estudios realizados de esta especie sobre (i) el ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación (Villacís *et al.*, 2008) (ii) nivel morfológico (Villacís *et al.*, 2010), y (iii) nivel ecológico, nos muestran que existen diferencias en las preferencias de micro-ambientes, como es el caso de Loja, dónde se encuentra en mayor densidad y colonizando el ambiente peridomiciliar (IC = 92,2%), mientras que en Manabí se encuentra principalmente en el hábitat silvestre (IC = 87,5%) asociado con nidos de ardilla (*Sciurus stramineus*), ratas (*Rattus rattus*) y aves (*Campylorhynchus fasciatus*) (Grijalva y Villacís, 2009; Suarez-Davalos *et al.*, 2010; Gijalva *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2011). La Introgresión entre vectores puede tener importantes consecuencias epidemiológicas. El flujo de genes en los loci que afectan a la capacidad vectorial, como los que controlan las preferencias de acogida y la susceptibilidad a la infección por parásitos, puede cambiar las características de la transmisión y, por consiguiente, hacer el control de la enfermedad una tarea difícil (Mazzoni *et al.*, 2006; Márquez *et al.*, 2011). La Introgresión de genes que controlan la adaptación a determinados tipos de medio ambiente también puede tener un impacto importante en la propagación de la ECh. Para evitar esto, se recomienda la necesidad de ampliar este análisis con poblaciones de *R. ecuadoriensis* que se encuentran en otras provincias del país. Respecto a la diferenciación genética entre sub-poblaciones (separación por hábitat dentro de cada región) *R. ecuadoriensis* del ambiente domiciliar de Loja con el domicilio de Manabí, presentó una pequeña diferenciación genética ($G_{ST} = 0.03550$). A diferencia entre los ambientes peridomiciliares y silvestres de las dos regiones (provincias) los valores fueron $G_{ST} = 0.06775$, y $G_{ST} = 0.05390$ respectivamente. En ambos casos, nos indican una moderada diferenciación

genética entre estas sub-poblaciones, es por eso, que se realizó el análisis tomando en cuenta las dos poblaciones (Loja y Manabí), y no a nivel de microambientes (hábitat).

A pesar de que estas dos poblaciones (centro costa y sur andina) pertenecen a ambientes con historias geológicas distintas, diversidad ambiental, características socio-económicas diferentes, es importante profundizar estudios sobre las condiciones físicas de los lugares de dónde proceden los especímenes. Las poblaciones genotípicamente idénticas, pueden tener variaciones fenotípicas debido a la influencia del medio ambiente, esto puede estar sugiriendo plasticidad fenotípica para estas poblaciones (Catalá *et al.*, 2004; Dorn *et al.*, 2009), sin necesidad de afectar al genotipo. Esta situación destaca los retos para la implementación de un programa de control efectivo en estas regiones, particularmente en la zona seca (Loja), donde *R. ecuadoriensis* mantiene poblaciones en los tres hábitats y en una zona con mayor humedad (Manabí) donde esta especie se encuentra en su mayoría en el ambiente silvestre y peridomiciliar.

6.5.2. MICROSATÉLITES DE *R. ecuadoriensis*

Una de las mejores herramientas para la genética de poblaciones, y estructura génica es la utilización de marcadores moleculares, como los microsatélites, ya que proveen de información relevante a nivel ecológico y evolutivo (Monteiro *et al.*, 1999; Abad-Franch y Monteiro, 2005; Marcet *et al.*, 2006). Para el presente estudio, se escogieron 6 microsatélites que amplificaron para la especie hermana de *R. ecuadoriensis*, *R. pallescens*, los mismos que fueron comprobados según Harry *et al.*, 1998.

En un principio el objetivo de este estudio fue utilizar esta herramienta, para conocer si existía una estructuración y diferenciación genética marcada de *R. ecuadoriensis* entre los diferentes micro-ambientes (hábitats) de las dos regiones. Sin embargo, durante el desarrollo, solamente se pudo utilizar dos loci (L13 y L47) con un patrón definido de alelos, lo cual dificultó obtener resultados confiables que muestren un buen soporte para los estudios de fenotipo. Los loci L9 y L25 fueron marcadores monomórficos y respecto a los microsatélites L3 y L43 presentaron mucha dificultad para su lectura; esa dificultad se relacionó con la cantidad de picos ambiguos que se observó con presencia de más de dos alelos en los electroferogramas; estos dos últimos no fueron tomados en cuenta para este análisis. Cada marcador presentó un patrón de alelos en particular, sin embargo, la presencia de picos poco claros y confusos se debe a la presencia de productos de amplificación no específicos, lo cual evidencia una falta de especificidad de los cebadores o “primers” utilizados. Su especificidad, se basa en la longitud del oligonucleótido, el contenido de guanina y citosina, y la temperatura de annealing (Dieffenbach, 1993; Muñoz, 2011). Esto nos lleva a pensar que es fundamental utilizar marcadores propios para cada especie (Marcet *et al.*, 2006), que apoyen a obtener resultados confiables para conocer la estructuración de poblaciones y subpoblaciones sin la necesidad de utilizar los microsatélites de especies hermanas como es el caso de *R. pallescens*. Adicionalmente, esto ayudará a ampliar el conocimiento de las relaciones entre poblaciones sinantrópicas con las silvestres.

Otro factor limitante en esta investigación es el área muestreada que se abarcó. En Manabí su muestreo se realizó en el Cantón Portoviejo, mientras que en Loja si se abarcó toda la provincia. Para lo cual se recomienda realizar estudios de estructuración genética de *R. ecuadoriensis* a una escala geográfica más extensa, que contemple las poblaciones de esta especie en el Ecuador y también poblaciones del norte de Perú.

El índice de fijación (F_{ST}) fue calculado por medio de la prueba genética de Nei (1973). Se presentaron en el L13 un 7.8% y en el L47 un 6.6% de alelos nulos, estos pueden ser un problema si solo tenemos dos loci polimórficos. Los alelos nulos son considerados una vez que han sido probados por tres veces y no se amplificaron para un locus específico. Solo un espécimen no se amplificó para los dos locus. El valor de F_{ST} generado para todos los dos locus fue de $F_{ST}= 0,191$ para las dos poblaciones, y por cada locus, L13 el $F_{ST}= 0,111$; mientras que para el L47 el $F_{ST}= 0,163$, demostrando que existe una diferenciación genética entre los especímenes de *R. ecuadoriensis* de Loja y Manabí $F_{ST} < 1$.

Al comparar a *R. ecuadoriensis* de los diferentes hábitats [domicilio, peridomicilio (sinantrópicos) y silvestre)] entre Loja y Manabí, observamos que si existe diferenciación genética; en el caso de Loja, observamos que los del domicilio Loja con el domicilio Manabí muestran un $F_{ST} = 0,178$, al igual que entre el domicilio de Loja con el peridomicilio de Manabí ($F_{ST} = 0,208$) y entre domicilio de Loja y el hábitat silvestre de Manabí ($F_{ST} = 0,107$). Sin embargo, si analizamos por separado por regiones, y entre hábitats, no se encontraron diferencias en la estructura poblacional $F_{ST} < 1$. Tanto en Loja como en Manabí, los valores obtenidos mostraron poca o ninguna diferenciación genética (Loja $F_{ST} = 0.000-0.008$) y (Manabí $F_{ST}= 0.000-0.05$), es decir, se encontró una similaridad genética entre los especímenes de los tres hábitats, indicándonos que existe un flujo entre los mismos ($p < 0,01$).

En el caso de Manabí, los especímenes estudiados en el ambiente domiciliario fueron colectados por los moradores de las comunidades durante la noche, los mismos que

parecen haber llegado volando, atraídos por la luz, visitan las UD, se alimentan y salen a buscar refugio en otro lugar. La estructura de cada vivienda dificulta el establecimiento de esta especie de triatomino (Grijalva *et al.*, 2011) en el intradomicilio. El flujo entre los tres hábitats también se observó en estudios de fenotipo solamente en la provincia de Manabí (Villacís *et al.*, 2010).

El índice de endogamia (F_{IS}) presentó un valor promedio entre las dos poblaciones de 0.28 sobre todos los locus polimórficos, indicándonos un cierto grado de diversidad genética entre los especímenes de las mismas. La baja diversidad genética es producto de altos niveles de endogamia, lo que puede reducir la aptitud del individuo y de sus poblaciones (Frankham, 2001; Freeland, 2005). En cuanto a las subpoblaciones, el H_o es $< H_e$, por lo que se asume que existe una mayor endogamia.

Finalmente, los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones sinantrópicas y silvestres se encuentran en un constante flujo génico y con reproducción al azar dentro de cada una de sus regiones (centro-coste y sur-andina); al presentar baja variabilidad genética entre subpoblaciones, parecería que la subpoblación silvestre se encuentra contribuyendo al pool genético sinantrópico en ambas regiones, ya que no presenta una diferenciación entre micro ambientes (subpoblaciones) y así se confirmaría la presencia de una sola población, por cada región.

Conociendo que el género *Rhodnius* se encuentra asociado mayoritariamente al ambiente silvestre, y que se ha observado una elevada capacidad adaptativa a los diferentes ambientes (Jaramillo *et al.*, 2000; Dujardin *et al.*, 2009; Márquez *et al.*, 2011); nuestros resultados junto con los estudios realizados en Venezuela, por Fitzpatrick *et al.*, (2008) con 10 microsatélites en *R. prolixus*, donde se observó una baja estructuración poblacional.

Nos sugiere que este género tiende a presentar una débil estructura genética, por la alta capacidad de adaptación a los ambientes sinantrópicos. La dinámica vectorial de *R. ecuadoriensis* en las dos regiones (centro y sur) del país es complicada. Las complejas relaciones existentes en la dinámica de transmisión de la ECh, tanto en la provincia de Loja como de Manabí, se vuelven un desafío para la reducción de la prevalencia especialmente de estas zonas que son endémicas para esta enfermedad.

6.6. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE ÍNDICES ENTOMOLÓGICOS, CRUCES EXPERIMENTALES, TÉCNICAS FENOTÍPICAS Y TÉCNICAS MOLECULARES

La morfología parece estar modulada por factores ecológicos, y pueden producir morfologías diferentes en poblaciones colectadas a lo largo de un amplio rango geográfico o en distintos hábitats, sean estos, domiciliar, peridomiciliar o silvestre. Estudios a nivel de fenotipo mediante la utilización de patrones de sensilla antenales y morfometría geométrica de alas, son muy importantes, pero deben ser complementados con estudios a nivel del genotipo, las causas genéticas que influyen sobre las variaciones morfológicas pueden deberse también a mutaciones que afectan a los genes que participan en la morfogénesis (Catalá y Dujardin, 2007). Las técnicas moleculares afianzan el conocimiento de la existencia o no de flujo genético tanto a nivel inter como intraespecífico.

Las poblaciones de la misma especie puedan estar diferenciadas genéticamente, debido a una correlación positiva con la distancia geográfica. A mayor distancia geográfica, mayor distancia genética, esto se corrobora en este estudio con *R.*

ecuadoriensis. Especímenes de las diferentes regiones Loja y Manabí tienen mayor diferenciación genética que la diferenciación entre hábitats, ya que se encuentran muy cercanas las sub-poblaciones (domiciliares vs. peridomiciliares vs. silvestres); claro está que esta diferenciación se muestra con los microsatélites que tienen el limitante de solo dos de ellos ser polimórficos, sin poder llegar a resultados certeros por su escasa información. Estudios de Chambers y MacAvoy, (2000) y Marcet *et al.*, (2006) recomiendan al menos de 7 a 10 microsatélites específicos de la especie para realizar una buena investigación. Así que sugiere el diseño y la utilización de al menos 10 nuevos microsatélites específicos para *R. ecuadoriensis*, de esta forma permitirá responder de mejor manera preguntas sobre la (i) dinámica de transmisión de ECh de esta especie en el Ecuador, (ii) proceso de infestación y re-infestación desde el ambiente silvestre hasta el ambiente sinantrópico (domicilio/peridomicilio), ya que es una pieza clave para entender la transmisión vectorial de esta especie en las dos provincias.

Sin embargo, esto no coincide con estudios del gen mitocondrial mt Cyt b, esto puede deberse a que el genoma mitocondrial muestra huellas que en algún momento de la historia evolutiva de esta especie. Además su origen es maternal, pudiendo replicarse sin recombinación; es más conservada y sus rangos evolutivos son más rápidos si comparamos con los marcadores nucleares (Avice, 1994; Abad-Franch y Monteiro, 2005); el número de individuos pudo haber aumentado rápidamente en un período de tiempo muy corto. Los resultados del mt Cyt b, en esta investigación nos muestran que existe una moderada diferenciación genética $G_{ST} = 0.05460$ entre las poblaciones de las dos provincias (Loja y Manabí), esto también se demuestra con la presencia de tres haplotipos compartidos (HELM6, HELM9 y HELM13). Esta moderada diferenciación genética podría explicarse por las tasas de migración (números de migrantes por generación) $N_m = 2,24$.

Adicionalmente, la presencia de tres haplotipos compartidos muestra una evidencia de introgresión entre las dos poblaciones (Loja y Manabí) de *R. ecuadoriensis*, al igual que estudios realizados por Mazzoni *et al.*, (2006) y Márquez *et al.*, (2011) en *Lutzomyia intermedia* y *L. whitmani* como también en *R. robustus* respectivamente. No obstante, con este marcador, también se obtuvo resultados que muestran la existencia de una tercera población, conformada por el haplotipo 8 (HEL8). Las dos de Loja, se ven influenciadas por la existencia de un aislamiento geográfico, que podría verse afectado también en aislamiento reproductivo, es decir, por lo tanto, menos propensos a la introgresión (Abad-Franch y Monteiro, 2005; Mazzoni *et al.*, 2006), es posible que, niveles más altos de flujo génico se den entre dos poblaciones, la una conformada por la mayoría de los haplotipos de Loja con la población de Manabí, y no entre las dos de Loja (HEL8). El estudio de mt cyt b, junto con los análisis fenotípicos, de ciclo de vida y hábitos de alimentación y defecación; apoya la hipótesis de una selección disruptiva, que probablemente tenga que ver con el aislamiento geográfico y las rutas de dispersión.

Respecto a los estudios de microsatélites, las estimaciones del índice de fijación $F_{ST} = 0,191$ nos indican que existe flujo génico entre las dos poblaciones Loja y Manabí, o que estas poblaciones son muy parecidas ($F_{ST} \leq 1$) y con un número de migrantes (N_m) para el L13 de 1,99; y para el L47 de 1,28 lo que sugiere que entre estas poblaciones si existieron migrantes como para que exista flujo génico, y de esta manera, permite mantener una conexión entre las mismas. La existencia de flujo genético entre poblaciones, se da como resultado de una homogeneidad genética entre ellas, para lo cual se necesita por lo menos de 1 migrante por generación (Wang, 2004; Abad-Franch y Monteiro, 2005). El movimiento de insectos entre poblaciones separadas por distancias medias y barreras geográficas, puede ser resultado del transporte pasivo asociado a migraciones de animales,

es decir, con los hábitos de su hospedero vertebrado (Catalá y Schofield 1994; Moncayo y Silveira, 2009).

Estudios de Schofield y Dujardin, (1999), Abad-Franch (2007) y Abrahan *et al.*, (2011) demuestran que mediante el vuelo de los adultos o la caminata de los estadios ninfales se puede proceder a la dispersión activa de los triatominos, este proceso está influenciado por algunos factores como: la búsqueda de hembra por parte del macho para copulación, proceso en el cual la hembra emite señales químicas que son detectadas por la sensilla antenal del macho, y también puede ser por la búsqueda de recursos alimenticios (hospederos), y/o refugio dependiendo a las altas densidades poblacionales o por la destrucción del hábitat que promueve la dispersión activa con el establecimiento en nuevos hábitats, razones que pueden explicar de una mejor manera la capacidad que tiene *R. ecuadoriensis* para adaptarse a los diferentes hábitats. La movilidad de los insectos determina en gran medida su supervivencia en ambientes modificados de modo que especies estenotópicas, de escasa movilidad, son más afectadas por los cambios ambientales (Samways, 1989). Un factor que tiene gran influencia en la riqueza específica de los fragmentos, es la heterogeneidad de hábitats (Gürtler, 1999; Hughes *et al.*, 2000), observándose en el caso de *R. ecuadoriensis*, una correlación positiva en la presencia y abundancia de especímenes entre hábitats más heterogéneos y riqueza de sus huéspedes (Brown Jr., 2000). Según Gürtler (1999), se define al peridomicilio como el ambiente más heterogéneo; ya que tiene muchas acumulaciones de objetos (leña, ladrillos) que favorece a la formación de refugios que albergan y proporcionan a los triatominos. En este estudio, también se corrobora que el peridomicilio, es el ambiente más heterogéneo, esto se demuestra con los índices de densidad (ID) y hacinamiento (IH), en Loja, en la cual se

presenta un ID = 7,7 y un IH = 76,1 en el peridomicilio; mientras que, la provincia de Manabí presentó un ID = 6,2 y IH = 45,2 el mismo hábitat.

Las poblaciones silvestres de la mayoría de las especies presentan mayor variabilidad que las especies domiciliadas (Arroyo *et al.*, 2007; Dumonteil *et al.*, 2007; Dujardin *et al.*, 2009). El proceso de domiciliación de los triatomíneos es de especialización que implica simplificación genética y fenotípica (Arroyo *et al.*, 2006; Esteban *et al.*, 2006). Diferentes estudios han demostrado la reducción progresiva de la variabilidad tanto en el número de receptores (Catalá y Schofield, 1994), en el tamaño y conformación alar (Jaramillo, 1999), como también en la secuencia de genes al comparar poblaciones silvestres y domiciliadas (Monteiro *et al.*, 2000; Abad-Franch y Monteiro, 2005; Pfeiler *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta estos resultados, se debe esperar que si ocurriera un proceso de domiciliación en los individuos de *R. ecuadoriensis*, estos tendrían mayor homogeneidad genética que los de las poblaciones silvestres estudiadas y esto favorecería a los sistemas de control del vector domiciliado al menos en una de estas provincias.

A causa del alto flujo genético reportado en el presente estudio, este vector pudiera ser considerado como un vector potencial para la transmisión de *T. cruzi*, y no se debería limitar a nombrarle como vector secundario en la provincia de Manabí. Tanto en las dos provincias, por la abundancia encontrada, la adaptación a los tres diferentes hábitats, y comportamiento de hábitos de alimentación y defecación como ciclo de vida, esta especie debería ser tomada en cuenta como especie primaria en el país; elemento a tener en cuenta en el momento de diseñar programas de Control y Vigilancia entomo-eco-epidemiológica en el país.

Finalmente, en el caso de Manabí, estudios de Grijalva *et al.*, (2011), indican que tanto la intervención con insecticidas combinados con las actividades educativas no fueron suficientes para producir una efectiva campaña de control de poblaciones en el peridomicilio, por lo que se recomienda apoyar como científicos al fortalecimiento de un Programa de Control Vectorial y Vigilancia Epidemiológica de la ECh; además, es necesario implicar y participar de estos procesos a todas las partes interesadas (habitantes, líderes políticos, empresas socio-económicas, servicios de salud y las campañas de educación, pero no solo en escuelas y colegios) tanto en la pre-intervención, la intervención propiamente dicha y la post-intervención.

La eliminación de las colonias domiciliarias de triatominos evita pérdidas de sangre que son, en ocasiones, causa de anemia (especialmente en niños); además, la infestación de gallineros puede provocar la disminución en la producción de huevos y aumenta la mortalidad de los polluelos, contribuyendo así a fomentar los ciclos de pobreza y malnutrición. El estrés psicológico y social al que se ven sometidas las personas de las comunidades por el hecho de vivir en una casa infestada por triatominos “chinchorros” desaparece al controlar la infestación, trayendo como consecuencia el incremento de autoestima y generación de una mejor disposición respecto al cuidado de las viviendas y, en general, a la salud de sus habitantes. La ECh no es sólo un problema médico-biológico que abarca a los diferentes componentes como: (i) parásito, (ii) vectores, (iii) hospederos (reservorios) y (iv) pacientes, sino que también, es una problemática socio-económica, que trata de concienciar para contribuir en el mejoramiento de la salud, educación, vivienda y calidad de vida de las familias que se encuentran en zonas endémicas de esta enfermedad.

Recomiendo finalmente, ampliar este mismo tipo de estudio con herramientas morfológicas y moleculares con especímenes de *R. ecuadoriensis* pero de sectores (norte, centro y sur) de Manabí, debido a que en esta investigación se analizaron solamente del cantón Portoviejo (centro de la provincia). Adicionalmente, más conocimiento se necesita de otras especies de triatomíneos, ya que, en el Ecuador se encuentran 15 especies adicionales, de donde, 7 de ellas son consideradas vectores potenciales.

7. LITERATURA CITADA

- Abad-Franch, F., Palomeque, F.S., Aguilar, H.M. 2001a. Control de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. FASBASE – Ministerio de Salud Pública del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Abad-Franch F., Paucar, A., Carpio, C., Cuba Cuba, C.A., Aguilar, H.M., Miles, M.A. 2001b. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: implications for the design of control strategies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 611-620.
- Abad-Franch, F. 2002. The ecology and genetics of Chagas disease vectors in Ecuador, with emphasis on *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). PhD Thesis, Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Universidad de Londres, Londres, Reino Unido.
- Abad-Franch, F., y Aguilar, V. H. M. 2003. Control de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador OPS/OMS (Publicación auspiciada por Ayuda Popular Noruega, Catholic Relief Services, COOPI, Médicos Sin Fronteras y Oxfam) Quito, Ecuador. Online <http://www.opsecu.org/publicaciones/OPS.doc>
- Abad-Franch, F., Palomeque, F.S., Aguilar, V.H.M., Miles, M.A. 2005. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Tropical Medicine and International Health* 10: 1258–1266.
- Abad-Franch, F., F.A., Monteiro. 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77: 437-454.
- Abad-Franch, F. 2007. Eco-epidemiología de la enfermedad de Chagas: La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral, Organización Panamericana de la Salud (OPS) / Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, Argentina p. 203-18.
- Abraham, L., Hernández, L., Gorla, D., Catalá, S. 2008. Phenotypic diversity of *Triatoma* infestans at the microgeographic level on the Gran Chaco of Argentina and the Andean valleys of Bolivia. *Journal of Medical Entomology* 45: 660-666.
- Adams, D.C., Rohlf, F.J., Slice, D. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the ‘revolution’. *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16.
- Aguilar, H.M., Abad-Franch, F., Racines, V.J., Paucar, A. 1999. Epidemiology of Chagas disease in Ecuador. A brief review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 387-393.
- Aguilar, H.M., Abad-Franch, F., Dias, J.C., Junqueira, A.C., Coura, J.R. 2007. Chagas disease in the Amazon Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 47-56.

- Allendorf, F.W., and Leary, R.F. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. pp. 57-76. In Soule (ed.) *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer. Sunderland, MA.
- Amato-Neto, V. 1999. Etiological treatment for infection by *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 337-339.
- Anderson, S., Bankier, T. A., Barrell, G. B., de Bruijn, L.H.M., Coulson, R. A., Drouin, J., Eperon, C.I., Nierlich, P.D., Roe, A.B., Sanger, F., Schreier, H. P., Smith, H.J.A., Staden, R., and Young, G.I. 1981. Sequence and organization of the human genome. *Nature* 290: 457-465.
- Anderson, J.M., Lai, J.E., Dotson, E.M., Cordon-Rosales, C., Ponce, C., Norris, D.E., Beard, C.B. 2002. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas Disease vector *Triatoma dimidiata*. *Infection, Genetics and Evolution* 1:243-248.
- Añez, N., Crisante, G., da Silva, F. M., Rojas, A., Carrascos, H., Umezawa, E. S., Stolf, A.M., Ramírez, J. L. and Teixeira, M. M. 2004. Predominance of lineage I *T. cruzi* isolates from Venezuela patients with different clinical profiles of acute Chaga's disease *Tropical Medicina and International Health* 9: 1319-1326.
- Arévalo, A., Carranza, J.C., Guhl, F., Clavijo, J.A., Vallejo, G.A. 2007. Comparación del ciclo de vida de *Rhodnius colombiensis* Moreno, Jurberg & Galvão, 1999 y *Rhodnius prolixus* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomédica* 27: 119-129.
- Armour, J.A., Neumann, R., Gobert, S., Jeffreys, A.J. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3: 599-565.
- Arroyo, C.M., Esteban, L., Catalá, S., Angulo, V.M. 2006. Antenal phenotype variation in sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from Santander, Colombia. *Revista Biomedica* 27: 92-100.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Beringham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, C. SN. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology, and Systematics* 18: 489-522.
- Avice, C.J. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, Nueva York.
- Avice, J. C., and Hamrick, J. L. 1996. *Conservation genetics, case histories from nature*. Chapman and Hall, New York.
- Avice, C.J. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge Massachusetts.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48

- Beals, M., Gross, L. y Harrell, S. 2000. Populations Genetics: Limits to Adaptation [en línea]. University of Tennessee, Knoxville, USA http://www.tiem.utk.edu/~gross/bioed/bealsmodules/population_genetics.html [Busqueda: agosto-2011].
- Barrett, T.V. 1991. Advances in triatomine bug ecology in relation to Chagas disease. *Advances in Disease Vector Research* 8: 143–176.
- Belisário, C.J., Avila Pessoa, G.C., Diotaiuti, L. 2007. Biological aspects of crosses between *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) and *Triatoma pseudomaculata* (Correa y Espinoña, 1964) (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 517-521.
- Bergmann, F. 1971. Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der IsoenzymIdentifizierung. En: Which DNA Marker for Which Purpose? Final Compendium of the Research Project Development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. (Gillet, E.M. ed.). 1999. URL [en línea]. Institut für Forst genetik und Forstpflanzenzüchtung, Universität Göttingen, Germany. <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm> [Consultado: Agosto, 2011].
- Bergmann, F., Gregorius, H.R., y Scholz, F. 1989. Isoenzymes, indicators of environmental impacts on plants or environmentally stable gene markers? En: Which DNA Marker for Which Purpose? Final Compendium of the Research Project Development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.(Gillet, E.M ed.). 1999. URL [en línea]. Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Universität Göttingen, Germany. <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm> [Consultado: Agosto, 2011].
- Black, C.L, Ocana, S., Riner, D., Costales, J.A., Lascanro, M.S., Dávila, S., Arcos-Terán, L., Seed, J.R., and Grijalva, M.J. 2007. Household risk factors for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador. *Journal of Parasitology* 93: 12-16.
- Black, C.L., Ocana-Mayorga, S., Riner, D.K., Costales, J.A., Lascano, M.S, Arcos-Terán, L., Preisser, J., Seed, J.R., Grijalva, M.J. 2009. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in rural Ecuador and clustering of seropositivity within households. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 1035-1040.
- Bookstein, F. L. 1996. A standard formula for the uniform shape component. En *Advances in Morphometrics*, editado por Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Slice, D. y Naylor, G. pp. 153-168. Plenum Press. Nueva York.
- Bosseno, M. F., Barnabé, C., Magallón Castélm, E., Lozano Kasten, F., Ramsey, J., Espinoza, B. and Breniere, S. F. 2002. Predeominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in México. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 627-632.
- Borror, D., Triplehorn, C., and Jonson, N. 1989. *An Introduction to the Study of Insects*. 6a ed. Philadelphia, EUA: Saunders College Publishing.

- Bowcock, A.M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J.R., and Cavalli-Sforza, L. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457.
- Briceño-León, R. 2009. La Enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de Ecosalud. *Cadernos de Saúde Pública* 25:S71-S82.
- Briceño-León, R., and Galván, J. M. 2007. The social determinants of Chagas disease and the transformation of Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 109-112.
- Brown, K. S. Jr. 2000. Butterflies as indicators for conservation in fragmented landscapes in the neotropics. XXI International Congress of Entomology, Brasil. Abstract, Book I: 107.
- Brutus, L., Schneider, D., Postigo, J., Romero, M., Santalla, J. and Chippaux, J. P. 2008. Congenital Chagas Disease: diagnosis and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia, *Acta Tropica* 106: 195-199.
- Bryan, R.T., Balderrama, F., Tonn, R.J., and Dias, J.C.P. 1994. Community participation in vector control: lessons from Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:61-71.
- Bustamante, D.M., Monroy, C., Menes, M., Rodas, A., Salazar-Schettino, P.M., Rojas, G., Pinto, N., Guhl, F., Dujardin, J.P. 2004. Metric Variation among Geographic Populations of the Chagas Vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and Related Species. *Journal of Medical Entomology* 41: 296-301.
- Cabello, D.R., Lizano, E., Valderrama, A. 1987. Estadísticas vitals de *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones experimentales. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 82: 511-524.
- Cáceres, A.G. 2005. Manual de procedimientos de identificación de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) del Perú. Centro Nacional de Salud, Lima, Perú.
- Cann, L.R., Stoneking, M., and Wilson, C.A. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325:31-36.
- Carbajal de la Fuente, A.L., and Catalá, S. 2002. Relationship among the habitat and the antennal sensilla pattern of six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 1121-1125.
- Carbajal de la Fuente, L., Noireau, F., Catalá, S.S. 2008. Inferences about antennal phenotype: the "*Triatoma maculata* complex" (Hemiptera: Triatominae) is valid?. *Acta Tropica* 106:16-21
- Carcavallo, R.U., Galíndez, I., Jurberg, J., Lent, H. 1998a. Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas. Vol. I. Editorial Fiocruz. Rio de Janeiro - Brasil.

- Carcavallo, R.U., Rodríguez, M.E.F., Salvatella, R. 1998b. Habitats and related fauna. En: Abad-Franch, F., Palomeque, F.S., Aguilar, V.H.M., y Miles, M.A. 2005. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Tropical Medicine and International Health*. Vol. 10, No. 12, pp. 1258–1266.
- Carcavallo, R.U. 1999. Climatic Factors Related to Chagas Disease Transmission. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94:367-369.
- Carcavallo, R.U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F., Galvão, C. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomology Vectors* 7: 1–99.
- Carvalho JR, Barretto MP 1976. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LX – Tentativas de cruzamento de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 con *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 18: 17-23.
- Casini, C.E., Dujardin, J.P., Martínez, M., Bentos-Pereira, A., Salvatella, R. 1995. Morphometric differentiation between two geographic populations of *Triatoma infestans* in Uruguay. *Research and Reviews in Parasitology* 55: 25-30.
- Catalá, S., and Schofield, C. 1994. Antennal sensilla of *Rhodnius*. *Journal of Morphology* 219: 193-204.
- Catalá, S. 1997. Antennal sensilla of Triatominae. A comparative study of five genera. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 26: 67-73.
- Catalá, S.S. 1998. Antennae and rostrum. In Carcavallo, R.U., Galindez, Jurberg, I.J., Lent, H. *Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas*, pp. 74-83. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.
- Catalá, S., and J. P. Dujardin. 2001. Antennal sensilla patterns indicate geographic and ecotopic variability among *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations. *Journal of Medical Entomology* 38: 423-428.
- Catalá, S., Maida, D.M., Caro-Riaño, H., Jaramillo, N. Moreno, J. 2004. Changes associated with laboratory rearing in antennal sensilla patterns of *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 25-30.
- Catalá, S., Sachetto, C. M., Moreno, R. P., Rosales, M., Salazar-Schettino, and Gorla, D. 2005. The Antennal Phenotype of *Triatoma dimidiata* Populations and its Relationship with Species of the phyllosoma and protracta Complexes. *Journal of Medical Entomology* 42: 719-725.
- Catalá, S.S., y Dujardin, J.P. 2007a. Estructuración poblacional en los triatominos. Una visión cuantitativa de la morfología. Capítulo del libro: *Triatominos de Bolivia*. Editado por el Ministerio de Salud de Bolivia. Programa Nacional de Chagas.

- Catalá, S.S, y Dujardin, J.P. 2007b. Los triatominos bajo el enfoque de la morfología cuantitativa. En: Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud y Deportes, Unidad de Epidemiología Programa Nacional de Chagas. Edición Mirko Rojas Cortéz. pp. 173-190.
- CDC. 2011. American Trypanosomiasis [en línea] <<http://www.dpd.cdc.gov/DPDX/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>> [Consultado: septiembre, 2011].
- Cecere, M.C., G.M. Vasquez-Prokopec, R.E. Güttler, U. Kitron. 2006. Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. *Emerging Infections Disease* 12: 1096- 1102.
- Cerisola, J. A. 1977. Chemotherapy of Chagas' infection in man. Scientific Publication, PAHO, No. 347.
- Chambers, G.K. MacAvoy, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126: 455–476.
- Costa, J. Almeida, C.E. Dujardin, J.P. Beard, C.B. 2003. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma braziliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 637-639.
- Costa, J., Townsend, P., Dujardin, J.P. 2009. Morphological evidence suggest homoploid hybridization as posible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution* 9: 263-270.
- Coura, J. R., de Castro, S. L. 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 3-24.
- Coura, J.R. 2007. Chagas Disease: what is Know and what is needed- a background article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 113-122.
- Coura, J.R. 2008. Curso de Capacitacitação dos microscopistas de Malária e dos laboratoristas da rede pública na deteccão de *T. cruzi*. FIOCRUZ. Pp 142-225.
- Crocco, L.B., Catalá, S. 1996. Feeding and defecation pattern in *Triatoma sordida*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 409-413.
- Cruz-López, L., Malo, E.A., Rojas, J.C., and Morgan, E.D. 2001. Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. *Medical and Veterinary Entomology* 15: 351–357.
- Cuba-Cuba, C.A., F. Abad-Franch, R.J. Roldán, V.F. Vargas, V.L. Pollack, M.A. Miles. 2002. The triatomines of northern Perú, with emphasis on the ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 175-183.

- Chagas, C. 1909. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Cheng, H.H., Levin, I.R., Vallejo, L., Khatib, H.J., Dodgson, B., Crittenden, L.B., and Hillel, J. 1995. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Science* 74: 1855-1874.
- Chevenet, 2006. TREEDYN 198. GEMI Bioinformatics U.M.R. 2724 CNRS-IRD & U.R.165 IRD Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses Centre de Recherche I.R.D. France. <http://www.treedyn.org>
- Christensen HA, Vásquez AM 1981. Host feeding profiles of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) in rural villages of Central Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30: 278-283.
- Dawson, R.J.G., Gibbs, H.L., Hobson, K.A., and Yezerinac, S.M. 1997. Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity* 79:506-514.
- Deane, M.P., Jansen, A.M., Lenzi, H.L. 1984. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79: 513-515.
- De Meeus, T., Lehmann, L., and Balloux, F. 2006. Molecular epidemiology of clonal diploids: a quick overview and short DIY (do it yourself) notice. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary genetics in infectious Diseases* 6:163-170.
- De Moraes, M.H., Guarneri, A.A., Girardi, F.P., Rodrigues, J.B., Eger, I., Tyler, K.M., Steindel, M., and Grisard, E.C. 2008. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi* infected patients sera. *Parasite and Vectors* 1: 20.
- De Souza, R., de Cássia-Moreira, S., Barbosa, E., Sonoda, I., Vieira, B.V., de Melo, A., Romanha, A.J., Diotaiuti, L. 2008. Population dynamics of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) in Itanhomi, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 14-20.
- Dias, J.C.P. 1991. Chagas disease control in Brazil: which strategy after the attack phase? *Annales de la Societe Belgue de Medecine Tropicale* 71: 75-86.
- Dias, J.C.P., Schofield, C.J. 1999. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 103-121.
- Dias, J.C.P. 2007. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas Disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 41: 193-196.

- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., Dveksler, G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Research* 3: S30-S37.
- Diotaiuti, L., Paula, O.R., Falcão, P.L., Dias, J.C.P. 1995. Avaliação do programa de controle vetorial da doença de Chagas em Minas Gerais, Brasil, com referencia especial ao *Triatoma sordida*. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 118. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud 211-219.
- Dobzhansky, T. 1937. *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, Nueva York.
- Dodgson, J.B., Cheng, H.H., Okimoto, R. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science* 76:1108-1114.
- Dorn, P., Dorn, P.I., Calderon, C., Melgar, S., Mogue, B., Solorzano, E., Dumonteil, E., Rodas, A., de La Rua, N., Garnica, R., Monroy, C. 2009. Two distinct *Triatoma dimidiata* (Laterille, 1811) Taxa are found in sympatry in Guatemala and México. *PloS Neglected Tropical Disease* 3: e393.
- Downe, A.E.R., and Archer, J.A. 1975. The effects of different blood meal sources on digestion and egg production in *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 12: 431-437.
- Dujardin, J.P., Panzera, F., Schofield, C.J. 1999. Triatominae as models of morphological plasticity under ecological pressure. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 223-228.
- Dujardin, J.P. 2000. *Introducción a la Morfometría (Con énfasis en Phlebotominae y Triatominae)*. Inédito.
- Dujardin, J.P., Le Pont, F. 2000. Morphometrics of a neotropical sandfly subspecies, *Lutzomyia carrerae thula*. *C. R. Academia of Sciences of Paris, Life Sciences*. 323: 273-279.
- Dujardin, J.P. 2006. Herramientas no moleculares en la sistemática moderna de los Triatominos. En VI Reunión de la IAPCECH. pp 305-313.
- Dujardin, J.P. 2007. Morphometrics in Medical Entomology. (<http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>).
- Dujardin, J.P., Beard, B., Rykman, R. 2007. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae. *Infection, Genetic and Evolution* 7: 161-167.
- Dujardin, J.P., Costa, J., Bustamante, D., Jaramillo, N., Catalá S. 2009. Deciphering morphology in Triatominae: the evolutionary signals. *Acta Tropica* 110: 101-111.
- Dumonteil, E., Tripet, F., Ramírez-Sierra, M.J., Payet, V., Lázaro, G., and Meni, F. 2007. Assesment of *Triatoma dimidiata* dispersal in the Yucatán Peninsula of México by Morphometry and Microsatellites Markers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 930-937.

- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
- Emerson BC, Paradis E, Thébaud C. 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *TRENDS in Ecology and Evolution* 16: 707-716.
- Espino, F., Koops, V., Manderson L. 2004. Community participation and tropical disease control in resource-poor settings. Geneva: World Health Organization (WHO)-TDR. Social, Economic and Behavioural Research Special Topics No.2.
- Esteban, L., Angulo, V.M., Feliciangeli, M.D., Catalá, S. 2006. Analysis of antennal sensilla patterns of *Rhodnius prolixus* from Colombia and Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 909-914.
- Excoffier L. y Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin (version 3.5): A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Falla, A., Herrera, C., Fajardo, A., Montilla, M., Vallejo, G. A. and Guhl, F. 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombia isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Tropica* 110: 15-21.
- Feliciangeli, M.D., Sanchez-Martin, M., Marrero, R. Davies, C. Dujardin, J.P. 2007. Morphometric evidence for a possible role of *Rhodnius prolixus* from palm trees in house re-infestation in the State of Barinas (Venezuela) *Acta Tropica* 101: 169-177.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Felsenstein, J. 2007. PHYLIP. <http://evolution.genetics.washington.edu/phyliip.html>
- Fitch, W.M. 1977. On the problem of discovering the most parsimonious tree. *American Naturalist* 111: 223-257.
- Fitzpatrick, S., Feliciangeli, M.D. Sanchez-Martin, M.J. Monteiro, F.A. Miles, M.A. 2008. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *PLoS Neglected Tropical Disease* 2: e210.
- Fitzpatrick, S., Watts, P.C. Feliciangeli, M.D. Miles, M.A. Kemp, S.J. 2009. A panel of ten microsatellite loci for the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution* 9: 206-209.
- Flores-Chavez, M. Fernández, B., Puente, S., Torres, P., Rodriguez, M., Monedero, C., Cruz, I., Gárate, T., and Cañavete, C. 2008. Transfusional Chagas Disease: Parasitological and Serological Monitoring of an Infected Recipient and Blood Donor. *Clinical Infectious Diseases* 46: 44-47.
- Forero, D., Weirauch, C., and Baena, M. 2004. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactocorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa* 670:1-12.

- Forés, R., Sanjuán, I., Portero, F., Ruiz, E., Regidor, C., López-Vélez, R., Linares, M., Gil, S., Ojeda, E., Krsnik, I., Bautista, G., Vallejo, C., García-Marco, J., Fernández, M.N. Cabrera, J.R., 2007. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39: 127-128.
- Footitt, R., Sorensen, J. 1992. Ordination Methods: Their Contrast to Clustering and Cladistic Techniques. En Sorensen JT, Footitt R, editors. *Ordination in the study of Morphology, Evolution and Systematics of insects: Applications and quantitative genetic rationals*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B V. pp 1-10.
- Franca-Rodríguez, M.E., Yong, D.G., Lozano, M. 1979. Estudio sobre los descendientes entre *Triatoma infestans* (Klug, 1834) y *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843, (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Biología Uruguay* 7: 101-115.
- Frankham R. 2001. Inbreeding and extinction in island populations: Reply to Elgar and Clode. *Conservation Biology* 15: 287-289.
- Frankham, R., J.D. Ballou, D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Freeland, J. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex. England.
- Friend, W., Choy C., Cartwrigth E. 1965. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology* 43: 891-904.
- Fu, Y.X., and Li, W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- García, A.L., Carrasco, H.J., Schofield, C.J., Valente, S.A., Frame, I.A., Stothard, R., Miles, M.A. 1998. Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of Triatomine bugs (Memiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 35: 38-45
- Galíndez, G.I., Barazarte, R., Márquez, J., Oviedo, M., Márquez, Y., Morón, L., Carcavallo, R.U. 1994. Relaciones reproductivas entre *Rhodnius prolixus* Stal y *Rhodnius robustus* Larrousse (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) bajo condiciones de laboratorio. *Entomología y Vectores* 1: 3-13.
- Galvão, C., R. Carcavallo, D. Silva Rocha, J. Jurberg. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Galvão, C., and Angulo, V. 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Departament of Santander, Colombia. *Zootaxa* 1241: 61-68.

- Gaunt, M., Miles, M. 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 557-565.
- Gibbs, H.L., Prior, K.A., Weatherhead, P.J., Johnson, G. 1997. Genetic structure of populations of the threatened eastern massasauga rattlesnake, *Sistrurus c. catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 6: 1123–1132.
- Giles, E.R., Blanc, H., Cann, M.H., and Wallace, C.D. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77: 6715-6719.
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., and Charnov, E.L. 2001. Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. *Science* 293:2248-2251.
- Giojala, L.C., Catalá, S.S, Asin, N., Gorla D. 1990. Seasonal changes in infectivity of domestic populations of *Triatoma infestans*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84:439-42, 1990.
- Godoy-Herrera, R. 2001. La conducta de Larvas de *Drosophila* (Diptera:Drosophilidae): su etología, desarrollo, genética y evolución. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 55-64.
- Goldstein, B.D., Ruiz-Linares, A., Cavalli-Sforza, L.L., and Feldaman, M.W. 1995a. Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proceedings National Academy of Sciences* 92:6723-6727.
- Goldstein, B.D., Ruiz-Linares, A., Cavalli-Sforza, L.L., and Feldaman, M.W. 1995b. An evaluation of Genetic Distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.
- Gómez-Palacio, A., Jaramillo-Ocampo, N., Triana-Chávez, O., Saldaña, A., Calzada, J., Pérez, R., Panzera, F. 2008. Chromosome variability in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Rhodniini). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 160-164.
- Gómez-Zurita, E., Petitpierre, E., Juan, C. 2000. Nested cladistic analysis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, Chrysomelidae). *Molecular Ecology* 9:557-570.
- Gracco, M., and Catalá, S. 2000. Interspecific and developmental differences on the array of antennal chemoreceptors in four species of Triatominae. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 67-74.
- Grijalva, M.J., Palomeque-Rodríguez, F.S., Costales, J.A., Dávila, S., Arcos-Terán, L. 2005a. High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in southern Ecuador. *Journal Medical Entomology* 42: 68-74.
- Grijalva, M.J., Chiriboga, R.F., Vanhassel, H., and Arcos-Terán, L. 2005b. Improving the safety of the blood supply in Ecuador through external performance evaluation of serological screening of blood donors. *Journal of Clinical Virology* 34: 47-52.

- Grijalva, M.J., and Villacís, A.G. 2009. Presence of *Rhodnius ecuadoriensis* in Sylvatic Habitats in the Southern Highlands (Loja Province) of Ecuador. *Journal Medical Entomology* 46: 708-711.
- Grijalva, M.J., Palomeque, F.S., Villacís, A.G., Black, C.L., Arcos-Terán, L. 2010. Absence of domestic triatomine colonies in an area where Chagas Disease is considered endemic in the coastal region of Ecuador. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 105: 677-681.
- Grijalva, M.J., Villacís, A.G., Ocaña-Mayorga, S., Yumiseva, C.A., Baus, E.G. 2011. Limitations of selective deltamethrin application for triatomine control in central coastal Ecuador. *Parasites and Vectors* 4: 1-10.
- Guarneri, A.A., Diotaiuti, L., Gontijo, N.F., Gontijo, A.F., Pereira, M.H. 2000a. Comparison of feeding behavior of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *Journal of Insect Physiology* 46: 1121-1127.
- Guarneri, A.A., Pereira, M.H., Diotaiuti, L. 2000b. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordid* and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 37: 373-379.
- Guhl, F., Jaramillo, C., Vallejo, G. A., Cárdenas, A., Arroyo, F., Aufderheide, A. 2000. Chagas disease and human migration. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 553-555.
- Guhl, F., Schofield, C.J. 2004. Proceedings of the ECLAT-AMCHA International Workshop on Chagas Disease Surveillance in the Amazon Region, Palmari, Brazil, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, 174 pp.
- Guhl, F. 2007. Chagas Disease in Andean Countries. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 29-37.
- Gumiel, M., Catalá, S., Noireau, F., Rojas de Arias, A., García, A., and Dujardin, J.P. 2003. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). *Systematic Entomology* 28: 173-180.
- Gürtler, R.E. 1999. Monitoreo poblacional de *T. infestans* durante la fase de vigilancia en una comunidad rural del noroeste argentino. *Medicina* 59: 47-54.
- Hall, T. 2007. BioEdit (version 7): A biological sequence alignment editor written for Windows. Ibis Biosciences. A subsidiary of Abbott Molecular, Carlsbad, CA. USA.
- Hanski, I. 1998. Metapopulation dynamics. *Nature* 396: 41-49
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequence: genomic context and mutational mechanisms. pp. 1-10. En: Goldstein, D., Schlotterer, C. Edición. *Microsatellites evolution and applications*, Oxford University Press, New York.

- Hartl, D.L. 2000. A primer of populations genetics. Sinauer Associates Inc. pp. 2. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Harry, M., Poyet, G. Romaña, C.A. Solignac, M. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the blood sucking bug *Rhodnius pallescens* (Heteroptera, Reduviidae). *Molecular Ecology* 7: 1771-1788.
- Harry, M., Dupont, L., Romaña, C., Demanche, C., Mercier, A., Livet, A., Diotaiuti, L., Noireau, F., Empereire, L. 2008a. Microsatellites markers in *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) Chagas Disease Vector in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 381-385.
- Harry, M., Roose, C.L., Vautrin, D., Noireau, F. . Romaña, C.A., Solignac, M. 2008b. Microsatellite markers from the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae), and their applicability to *Rhodnius* species. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 381-385.
- Harvey, P.H., and Steers, H. 1999. One use of phylogenies for conservation biologists: inferring population history from gene sequences. pp. 101-120 In *Genetics and the Extinction of Species*. Landweber, L.F., and Dobson, A.P. eds. Princeton University Press, Princeton.
- Hedrick, P.W. 2000. *Genetics of populations*. Jones & Bartlett Publishers. Boston.
- Henderson, A., G. Galeano, R. Bernal. 1995. *Field Guide to the Palms of the Americas*. Princeton University Press, Princeton, NY, USA, 363 pp.
- Hernández, M.L, Abrahan, L., Moreno, M., Gorla, D., Catalá, S. 2008. Phenotypic Variability Associated to Genomic Changes in the main vector of Chagas Disease in South America. *Acta Tropica* 106: 60-67.
- Hernández, M.L, Abrahan, L., Dujardin, J.P., Gorla, D. Catalá, S. 2011. Phenotypic Variability and Population Structure of Peridomestic *Triatoma infestans* in Rural Areas of the Arid Chaco (Western Argentina): Spatial Influence of Macro and Microhabitats. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11: 503-513.
- Herrera, C., Bargues, M. D., Fajardo, A., Montilla, M., Triana, O., Vallejo, G. A. and Guhl, F. 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infections, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary genetics in Infectious Diseases* 7: 535-539.
- Hughes, J.B., Daily, G.C., and Ehrlich, P.R. 2000. Conservation of insect diversity: a habitat approach. *Conservation Biology* 14: 1788-1797.
- Huntley, B., and Webb, T. 1989. Migration: Species's response to climatic variations caused by changes in the earth's orbit. *Journal of Biogeography* 16: 5-19.
- Hypša, V., Tietz, D., Zrzavý, J., Rego, R., Galvao, C. and Jurberg, J. 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New

- World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 447-457.
- INAMHI. 2011. Climatología: características generales del clima en el Ecuador. ESPOL. Guayaquil. Ecuador.
- INEC. 2009. Almanaque El universo. Hidrografía e Orografía de Loja. pp. 116.
- INEC. 2011. Almanaque El Universo. Población provincial por año censal de Loja. pp 88.
- Jarrín P. 2005. Aspectos Básicos sobre el estudio de la Variación Morfológica. pp. 69-94 *Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador*.
- Jaramillo, N. 1999. Partición en Tamaño y Forma de los Caracteres métricos y su interés en los estudios poblacionales aplicados a los Triatominos. Tesis de Doctorado, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Jaramillo, N., Schofield, C.J., Gorla, D., Caro-Riaño, H., Moreno, J., Mejía, E., Dujardin, J.P. 2000. The role of *Rhodnius pallescens* as a vector of Chagas disease in Colombia and Panama. *Research and Reviews in Parasitology* 60: 75-82.
- Jaramillo, N. Dujardin, JP. 2002. Análisis Morfométrico: significado biológico del tamaño y la conformación. Colombia. Inédito.
- Jaramillo, N., Calle, L.A., Riaño, H., Calle, J., and Ortega-Barría, J. 2002. Diferencias morfométricas asociadas a la distribución de *Rhodnius pallescens* provenientes de siete localidades de Colombia y Panamá. Taller Técnico de Estudio sobre *Rhodnius pallescens*, su Vigilancia y Control. OPS 15-23
- Jolicoeur, P. 1963. The multivariate generalization of the allometry equation. *Biometrics* 19: 497-499.
- Jolliffe, I.T. 2002. Principal Component Analysis. Second Edition. Springer-Verlag, New York, USA.
- Juan, C., Emerson, B.C., Oromí, P., and Hewitt, G.M. 2000. Colonization and diversification: Towards a phylogeographic synthesis for the Canary Islands. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 104-109.
- Kalinowski, S.T. 2004. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics* 5: 539–543.
- Kendall, D. 2007. Kendall BioResearch Services Insect Taxonomy - Agroecology - Biometrics - Expert Witness. Consultado el día 12 de septiembre de 2011 de World Wide Web: <http://www.kendall-bioresearch.co.uk/site.htm>.
- Kimura, M., and Crow, J.T. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738

- Kirchhoff, L. V., Weiss, L. M., Wittner, M., Tanowitz, H. B. 2005. Parasitic Diseases of the Heart. *Frontiers in Bioscience* 9: 706–23.
- Kleywegt, G.J. 2005. SeqMan (version 6): An assembling and editing sequencing projects using capillary sequence data from the ABI 3130 and 3730 sequencing platform Uppsala University, Uppsala, Sweden. Unpublished program.
- Leberg, P. L. 2002. Estimating allelic diversity: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* 11:2445-2449.
- Lent, H., León, L.A. 1958. Um novo *Rhodnius* Stål do Ecuador (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia* 18: 181-185.
- Lent, H., Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 123-520.
- Librado, P., and Rozas, J. 2009. DnaSP (version 5.10): A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Acosta, N., Yeo, M., Carrasco, H. J., Segovia, M., Vargas, J., Torrico, F., Miles, M. A. and Gaunt, M. W. 2009. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellites analysis and potential impact in emergent Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Disease* 3 (9): e510.
- López-Antuñano, F., Rangel-Flores, H. and Ramos, C. 2000. Diagnosis of Chagas' Disease. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 121-129.
- López, G., Moreno, J. 1995. Genetic variability and differentiation between populations of *Rhodnius prolixus* and *R. pallescens*, vectors of Chagas disease in Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 90: 353-357.
- Lorenzo, M.G., Flores, G.B., Lazzari, C.R., Reisenman, C.E. 1999. Sensory ecology. A: orientation. In: Carcavallo, et al. (Eds.), *Atlas of Chagas' Disease Vectors in America*, vol. 3, pp 1071–1087. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Lorenzo-Figueiras, A.N., Lazzari, C.R. 1998. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. *Physiology Entomology* 23: 33–37.
- Luikart, G., and England, P.R. 1999. Statistical analysis of microsatellite DNA data. *TREE* 14:253-256.
- Luquetti, A. O., Ponce, C., Ponce, E., Esfandiari, J., Schijman, A., Revollo, S., Añez, N., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Gonzalez, A., Levin, M. J., Umezawa, E. S. and Franco da Silveira, J. 2003. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Statpak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 46: 265-271.

- Lyman, D.F., Monteiro, F.A., Escalante, A.A., Cordon-Rosales, C., Dawn, M., Dujardin J.P., and Beard, C.B. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 377-386.
- Marcet, P.L., Lehmann, T., Groner, G., Gurtles, R.E., Kitron, U., and Dotson, E.M. 2006. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution* 6: 32-37.
- Marcili, A., Lima, L., Valente, V. C., Valente, S. A., Bastita, J. S., Junqueira, A. C., Souza, A. I., da Rosa, J. A., Campaner, M., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Miles, M. A and Teixeira, M. M. 2009. Comparative phylogeographic of *Trypanosoma cruzi* TcIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary genetics in Infectious Disease* 9: 1265-1274.
- Marcilla, A., Bargues, M., Abad-Franch, F., Panzera, F., Carcavallo, R., Noireau, F., Galvão, C., Miles, M., Dujardin, J., and Mas-Coma, S. 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution* 1: 225-335.
- Marín-Neto, J. A., Rassi Jr, A., Avenzum Jr, A., Mattos, A. C. and Rassi, A. 2009. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 319-324.
- Marquardt, W.C., B.C. Kondratieff, C.G. Moore, J.E. Freier, H.H. Hagedorn, W.C. Black IV, A.A. James, J. Hemingway, S. Higgs. 2005. *Biology of Disease Vectors*. Second edition. Elsevier Academic Press. London, UK.
- Márquez, E., Jaramillo-O, N., Gómez-Palacio, A., Dujardin, J.P. 2011. Morphometric and molecular differentiation of a *Rhodnius robustus*-like form from *R. robustus* Lrousse, 1927 and *R. prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Tropica* 120: 103-109
- Matias, A., De la Riva, J.X., Torrez, M., Dujardin, J.P. 2001. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by its wings. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 947-950.
- Martinez-Ibarra, J.A., López, M., Hernández, M., Grant- Guillén, Y. 2003. Influence of the blood meal source on the biology of *Meccus picturatus* Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 227-232
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, Nueva York.
- Mazzoni, C.J., Souza, N.A., Andrade-Coelho, C., Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A. 2006. Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the period gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. *Evolutionary Biology* 6: 85.

- McIver, S. 1987. Sensilla of haematophagus insects sensitive to vertebrate host-associated stimuli. *Insect Science and its Application* 8: 627-635.
- Meneghelli, U. G. 1999. Clinical treatment of the digestive form of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 341-342.
- Miles, M. A. 2009. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). En *Manson's Tropical Diseases. Protozoan Infectious* (G.C. Cook y A.I. Zumla, eds) pp. 1327-1339. Saunders Elsevier Limited.
- Moncayo, A. 1997. Progress towards elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. *WHO World Health Statistics Quarterly* 50:195-198.
- Moncayo, A. 1999. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 401-404.
- Moncayo, A. 2004. Global Epidemiology of Infectious Diseases: Chagas Disease. Chapter II, pp. 325-348.
- Moncayo, A. and Silveira, A.C. 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 17-30.
- Monteiro, F.A., Pérez, R., Panzera, F., Dujardin, J.P., Galvão, C., Rocha, D., Francois, N., Schofield, C., and Beard, C.B. 1999. Mitochondrial DNA Variation of *Triatoma infestans* Populations and its Implication on the Specific Status of *T. melanosoma*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 229-238.
- Monteiro, F.A., Wesson, D.M., Dotson, E.M., Schofield, C.J., Beard, C.B. 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 460-465.
- Monteiro, F., Barrett, T., Fitzpatrick, S., Cordon-Rosales, C., Feliciangeli, D. and Beard, C. 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology* 12: 997-1006.
- Monroy, C., Bustamante, D., Rodas, A., Rosales, R., Mejía, M., Tabaru, Y. 2003. Geographic Distribution and Morphometric Differentiation of *Triatoma nitida* Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Guatemala. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 37-43.
- Moreno, J, Galvão, C., and Jurgerg, J. 1999. *Rhodnius colombiensis* sp. n. da Colombia com quadros comparativos entre estruturas fállicas do gênero *Rhodnius* Stal. 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología de Vectores* 6: 601-616.
- Moreno, M., Gorla, D., and Catalã, S. 2005. Association between antennal phenotype, wing polymorphism and sex in the genus *Mepraia* (Reduviidae: Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution* 6: 228-234

- Moritz, C. 1994. Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9:373-375.
- Moritz, C., and Hillis, D. M. 1996. Molecular systematics: context and controversies. In *Molecular Systematics*, Second Edition, eds. Hillis, D. M., Moritz, C., and Mable, B. K. pp. 1-13. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Mundy, N.I., and Woodruff, D.S. 1996. Polymorphic microsatellite markers in the loggerhead shrike, *Lanius ludovicianus*, isolated from a library enriched for CA repeats. *Molecular Ecology* 5:811-813.
- Muñoz, J., Coll, O., Juncosa, T., Verges, M., Del Pino, M., Fumado, V., Bosch, J., Posada, E.J., Hernández, S., Fisa, R., Boguña, J.M., Gállego, M., Sanz, S., Portús, M., Gascón, J. 2009. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending two maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clinical Infectious Disease* 48:1736–1740.
- Muñoz, S.I. 2011. Análisis preliminar del estructura genética de poblaciones sinantrópicas de *R. ecuadoriensis* (Lent y León) de la provincia de Manabí. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Nattero, J.L., Crocco, B., Rodriguez, C.S. 2002. Feeding and defecation behaviour of *Triatomapatagonica* (Del Ponte, 1929) (Hemiptera: Reduviidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 1063-1065.
- Nayar, J.K., Sauerman, D.M. 1977. The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes. Part 4. Effects of blood source on oocyte development. *Journal of Medical Entomology* 14: 167-174.
- Neghme, A. 1962. La tripanosomiasis en América. *Creces* 3:23-28.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- Nei, M. 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annual Review Genetics* 30: 371-403.
- Neigel, J.E. 2002. Is F_{ST} obsolete?. *Conservation Genetics* 3: 167–173.
- NETWORKv. 4.5 software, <http://www.fluxusengineering.com> (Agosto, 2011).
- Nogueda-Torres, B., Aguilar, R.A., Tornell, L.I., Camacho, A.D. 2000. Defecation pattern in seven species of triatomines (Insecta, Reduviidae) present in México. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 145-148.

- Noireau, F., Gutierrez, T., Zegarra, M., Flores, R., Breniere, F., Cardozoz, L., Dujardin, J.P. 1998. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. *Tropical Medicine and International Health* 5: 364-372.
- Noireau, F., Flores, R., Vargas, F. 1999. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 13-14.
- Noireau, F., Abad-Franch, F., Valente, S.A.A., Dias-Lima, A., Lopes, C.M., Cunha, V., Valente, V.C., Palomeque, F.S., de Carvalho-Pinto, C.J., Sherlock, Í., Aguilar, M., Steindel, M., Grisard, E.C., Jurberg, J. 2002. Trapping Triatominae in Sylvatic Habitats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 61-63.
- Normark, B. B., and Lanteri, A.A. 1998. Incongruence between morphological and mitochondrial DNA characters suggests hybrid origins of parthenogenetic weevil lineages (genus *Aramigus*). *Systematic Biology* 47:475-494.
- Ocaña-Mayorga, S. B. 2010. Determinación de linajes y dinámica de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en dos provincias endémicas para la Enfermedad de Chagas. Tesis de Doctorado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Ocaña-Mayorga, S., Llewellyn, M.S., Costales, J.A. Miles, M.A. 2010. Sex, Subdivision, and Domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. *PLOS Neglected Tropical Disease* 4(12): e915.
- Odum, E.P. 1986. *Fundamentos de la Ecología*. INTERAMERICANA. México. pp 3.
- Orellana-Halkyer, N., Arriaza-Torres, B. 2010. Enfermedad de Chagas en poblaciones prehistóricas del norte de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 83: 531-541.
- OPS/OMS. 1999. *Estándares de trabajo para Bancos de Sangre*, Segunda edición.
- OPS/OMS. 2004. V^a Reunión de la Iniciativa Andina de Control de la Enfermedad de Chagas (IPA)
- Panzer, F., Ferrandis, I., Ramsey, J., Ordoñez, R., Salazar, R., Cabrera, M., Monroy, C. 2006. Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas Disease vectors. *Tropical Medicine and International Health* 11: 1092-1103
- Patterson, J. 1979. The effect of larval nutrition on egg production in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 25: 311-314.
- Page, R.D.M. and Holmes. E.C. 1998. *Molecular Evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell Science, London, UK.
- Peakall, R., Smouse, P. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel, population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.

- PEED - Programa de Evaluación Externo del Desempeño, Multipanel CIEI 118. 2011. Grijalva, Chiriboga, Cueva, Crespo. Informe de Resultados Generales.
- Pennington, P. M. Paiz, C., Grajeda, L. M. and Córdón-Rosales, C. 2009. Short report: Concurrent detection of *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in domestic *Triatoma dimidiata* from Guatemala. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 80: 239-214.
- Pereira, J., Dujardin, J.P., Salvatella, R. and Tibayrenc, M. 1996. Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. rubrovaria*. Heredity 77: 47-54.
- Pérez, R., Hernández, M., Quintero, O., Scvortzoff, E., Canale, D., Méndez, L., Cohanoff, C., Martino, M., Panzera, F. 2005. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). Genetica 125: 261-270.
- Pérez de Pedro, I., Martín Rico, P., Santamaría, S., Faez, Y., Blanc, P., Pascual, M.J., Cuesta, M.A., Villalta, M.C., Muñoz –Pérez, M.I., Vidales, I., Heiniger, A.I. 2008. Caso clínico de Chagas transfusional. Journal of Emergency Medicine 10:14-18.
- Pfeiler, E. Bitler, B.G., Ramsey, J.M., Palacios-Cardiel C., Markow, T.A. 2006. Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. Molecular Phylogenetics and Evolution 41: 209–221.
- Pimentel, RA. 1992. An introduction to ordination, principal components analysis and discriminant analysis. En: RG Foottit and JT Sorensen editors. Ordination in the study of morphology, evolution and systematics of insects: applications and quantitative genetic rationales. pp. 418. Elsevier, New York.
- Pintaud. J., Galeano, G., Balslev, H., Berna, B., Borchsenius, F., Ferreira, E., de Granville, J.J., Mejía, K., Millán, B., Moraes, M., Noblick, L., Stauffer, F.W., Kahn, F. 2008. Las palmeras de América del Sur: diversidad, distribución e historia Evolutiva. Revista Peruana de Biología 15: 7-29
- Pinto, C.M. 2005. Infección natural por tripanosomas en mamíferos silvestres y domésticos en las Provincias de Manabí, Loja y Guayas, Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Pinto, C. M., Ocaña-Mayorga, S., Lascano, M. S. and Grijalva, M. J. 2006. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. Journal of Parasitology 92: 1251-1255.
- Pinto Dias, J.C., Prata, A., Schofield, C. J. 2002. Doença de Chagas na Amazonia: esboço da situação atual a perspectivas de prevenção. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 35: 669-678.
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C.E. Casas, A., Castañeda Sortibrán, A., Castillo, A., Cerritos, R., Chassin-Noria O., García Marín, P.C.,

- Delgado, P., Píndaro Díaz, J., Eguiarte, L.E., Escalante, A.E., Espinoza, B., Fleury, A., Flores Ramírez, S. et al. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México, vol. I : Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 437-494.
- Pizarro, J.A., and Romaña, C. 1998. Variación Estacional de una población Silvestre de *Rhodnius pallescens* (Barber, 1932) (Heteroptera: Triatominae) en la Costa Caribe Colombiana. Bulletin de l'Institut Français d'Études Andines 27: 309-325.
- Poinar, G. 2005. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the First Fossil Evidence of a Triatomine-Trypanosomatid Vector Association. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 5: 72-81.
- Ponce, C., Ponce, E., Vinelli, E., Montoya, A., de Aguilar, V., González, A., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Levin, M. J., Esfandiari, J., Umezawa, E. S., Luquetti, A. O., da Silveira, J. F. 2005. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' Disease by detection of *Trypanosoma cruzi*- specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. Journal of Clinical Microbiology 43: 5065-5068.
- Ponsuksili, S., Wimmers, K., Schmoli, F., Horst, P., and Schellander, K. 1999. Compariso of Multilocus DNA fingerprints and Microsatellites in an Estimate of Genetic Distance in Chicken. The Journal of Heredity 90: 656-659.
- Posada, D., and Buckley, T.R. 2004. MODELTEST (version 3.7.): Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. Systematic Biology 53: 793-808.
- Primmer, C.R., and Ellegren, H. 1998. Patterns of Molecular Evolution in Avian Microsatellites. Molecular Biology and Evolution 15: 997-1008.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of Population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.
- Rabinovich, J.E., Leal, J.A., Feliciangeli de Piñero, D. 1979. Domiciliary biting frequency and blood ingestion of the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae) in Venezuela. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 73: 272-283.
- Rassi, A., y Marín-Neto, J.A. 2010. "Chagas disease". Lancet 375: 1388-402.
- Reyes, P.A., and Vallejo, M. 2008. Fármacos tripanocidas para la fase crónica de la enfermedad de Chagas sintomática (infección por *Trypanosoma cruzi*). Biblioteca Cochrane Plus. Volumen 2. pp. 2-4.
- Riaño, H., Jaramillo, C.N., and Dujardin, J.P. 2009. Growth changes in *Rhodnius pallescens* undersimulated domestic and sylvatic conditions. Infection, Genetics and Evolution 9: 162-168.

- Ribeiro J.M.C., Schneider, M., Isaias, T., Jurberg, J., Galvão, C., Guimarães, J.A. 1998. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *Journal of Medical Entomology* 35: 599-610.
- Rohlf, J. 1990. *Morphometrics*. Revista Ecología y Sistemática Department of Ecology and Evolution, State University of New York, USA.
- Rohlf, J. Marcus, L. 1993. A Revolution in Morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*. 8: 129-132.
- Rohlf, FJ. 1999. Shape statistics: procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification* 16:197-223.
- Rozas, M., Botto-Mahan, C., Coronado, X., Ortiz, S., Cattán, P. E. and Solari, A. 2007. Coexistencia of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 647-653.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn G.T., Erlich, H.A. 1985. Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with Thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Samways, M. J. 1989. Insect conservation and landscape ecology: a case-history of bush crickets (Tettigoniidae) in southern France. *Environmental Conservation* 16: 217-226.
- Samways, M. J. 1994. *Insect conservation biology*. Chapman and Hall. London, New York.
- Sandoval, C., Joya, M., Gutiérrez, M., and Angulo, V. 2000. Cleptohaemaphysia in *B. herreri*. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 100-101.
- Sanmartino, M. 2009. 100 años de Chagas (1909-2009): revisión, balance y perspectiva *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 68: 243-252.
- Schijman, A.G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., 2011 International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *PLoS Neglected Tropical Disease* 5(1): e931. doi:10.1371.
- Schofield, C.J. 1985. Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale* 65: 149-64.
- Schofield, C.J. 1994. *Triatominae, biología y control*. Eurocommunica Publications, West Sussex, Reino Unido.

- Schofield, C.J., Dujardin, J.P., Jurberg, J. 1996. Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae (Taller Internacional sobre Genética Poblacional y Control de Triatómíneos). pp. 116. Santo Domingo de los Colorados, Ecuador (24-28/9/1995). INDRE. México.
- Schofield, C.J., Dujardin, J.P. 1997. Chagas disease vector control in Central America. *Parasitology Today* 13: 141-144.
- Schofield, C.J., y Dujardin, J.P. 1999. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actualidades Biológicas (Medellín)* 70: 183-197
- Schofield, C. J. 2000a. *Trypanosoma cruzi* the vector-parasite paradox. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 535-544.
- Schofield, C.J. 2000b. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cadernos de Saúde Pública* 16: 89-92.
- Schofield, C. J. 2001. Global collaboration for development of pesticides for public health. Field testing and evaluation of insecticides for indoor residual spraying against domestic vectors of Chagas disease. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP. pp. 59.
- Schofield, C.J. and Galvão, C. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica* 110: 88-100.
- Schachter-Broide, J., Dujardin, J.P., Kitron, U., Gutler, R.E. 2004. Spatial Structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) Populations from Northwestern Argentina Using Wing Geometric Morphometry. *Journal of Medical Entomology* 41: 643–649.
- Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers- just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 63-69.
- Sierra, R. 1999. Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador Continental. Quito: Proyecto INEFAN/ BIRF y Ecociencia.
- Silva, C., Eguiarte, L.E., and Souza, V. 1999. Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli in a traditionally managed locality in Mexico. *Molecular Ecology* 8: 277-287.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457–462.
- Soares, R., Sant'Anna, M., Gontijo, N., Romanha, A., Diotaiuti, L., and Pereira, M. 2000. Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera:Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene* 62: 157-161.
- Sokal, R.R. 1979. Systematic Zoology. Testing statistical significance of geographic variation patterns. 28: 227-232.

- Soltis, D. E., Soltis, P. S y Doyle, I. J. 1998. Molecular systematic of plants II: DNA sequencing. Kluwer Academic Publishing, Boston, Dordrecht y Londres.
- Sosa-Estani, S., Segura, E. L. 1999. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines of treatment in Argentina. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94: 363-365.
- Sosa-Estani, S., Gamboa-León, M.R., del Cid-Lemus, J., Althabe, F., Alger, J., Almendares, O., Cafferata, M.L., Chippaux J.P., Dumonteil, E., Gibbons, L., Padilla-Raygoza, N., Schneider, D., Belizán J. M., Buekens P., and Working Group. 2008. Short Report: Use of a Rapid Test on Umbilical Cord Blood to Screen for *Trypanosoma cruzi* Infection in Pregnant Women in Argentina, Bolivia Honduras, and México. American Journal Tropical Medicine and Hygiene 79: 755–759.
- Sosa-Estani, S., Viotti, R. and Segura, E. L. 2009. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease; insight gained in Argentina. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104: 167-180.
- Sousa, O.E., y Saldaña, A. 1994. Enfermedad de Chagas: Aspectos epidemiológicos y relaciones antigénicas entre tripanosomas en áreas de transmisión por *Rhodnius pallescens*. Revista Médico Científica 9:16-23.
- Southgate, D. 1997. Alternatives for Habitat Protection and Rural Income Generation. Document ENV-107. The Inter-American Development Bank, Washington, DC, USA, 54 pp.
- Suárez, M.V. 2008. Ecología de Triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) peridomiciliares y silvestres en las Provincias de Loja y Manabí. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Suarez-Davalos M.V., Dangles, O., Villacís, A.G., Grijalva, M.J. 2010. Microdistribution of sylvatic triatomine populations in Central-coastal Ecuador. Journal Medical Entomology 47: 80-88.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. Trends in Ecology and Evolution 15:199–203.
- Susunaga, G., Monroy, E., Vallejo, G.A. 1991. Caracterización biológica de cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas en Coyaima (Departamento del Tolima). Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas 5: 53-63.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics 105: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tarleton, R. L., Reithinger, R., Urbina, J. A., Kitron, U. and Gurtler, R. E. 2007. The challenges of Chagas Disease-grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Medicine* 4: e332.
- Tartarotti, E., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Ceron, C.R. 2006. Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Brazilian Journal of Biology* 66: 703-708.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphism markers. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4138.
- Tautz, D., and Schlötterer, C. 1994. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 832-837.
- Terán, D. 2010. Dinámica espacio-temporal de triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) silvestres y domiciliarios en una comunidad rural de la Provincia de Manabí, Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Thomas, C.D. 1994. Extinction, colonization, and metapopulations: environmental tracking by rare species. *Conservation Biology* 8: 373-378.
- Troya, A.M. 2006. Diversidad Genética de Poblaciones de *Polylepis incana* Kunth en el Centro-Norte del Ecuador Mediante AFLPS: Una aproximación a su manejo y conservación. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Usinger, R.L., Wygodzinsky, P. & Ryckman, R., 1966. The biosystematics of Triatominae. *Annual Review of Entomology* 11: 309-330.
- Vanhala, T., Tuiskula-Haavisto, M., Elo, K., Vilkki, J., and Maki-Tanila, A. 1998. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science* 77: 783-790.
- Vargas, F., Cordova-Paz, S.O, Marin, C., Rosales J., Sanchez-Gutierrez, R. 2007. Epidemiology of American trypanosomiasis in northern Peru. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 101: 643-648.
- Vazquez-Prokopec, G.M., Ceballos, L.A., Cecere, M.C., Gürtler, R.E. 2003. Seasonal variations of microclimatic conditions in domestic and peridomestic habitats of *Triatoma infestans* in rural northwest Argentina. *Acta Tropica* 84: 229-238.
- Villacís, A. 2006. Ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación de *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & León, 1958 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

- Villacís, A.G., Arcos-Terán, L., Grijalva, M.J. 2008. Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 690-695.
- Villacís, A.G., Grijalva, M.J., Catalá, S.S. 2010. Phenotypic variability of *Rhodnius ecuadoriensis* populations at the Ecuadorian central and southern Andean region. *Journal of Medical Entomology* 47:1034-1043.
- Villalba, R., Fornes, G., Alvarez, M.A., Roman, J., Rubio, V., Fernández, M. 1992. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: Case report. *Clinical Infectious Disease* 14: 594–595.
- Villegas, J., Feliciangeli, M., and Dujardin, J. 2002. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). *Infection, Genetics and Evolution* 2:121-128.
- Villela, M.M., Catalá, S.J., Jurberg, Silva, I.G., Dias, J.C.P. 2005. Patterns of antennal sensilla of *Panstrongylus megistus* from three Brazilian states. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 699-702.
- Wang, J. 2004. Application of one-migrant per generation rule to conservation and management. *Conservation Biology* 18(2): 332-343.
- Waser, N.M., and Price, M.V. 1993. Crossing distance effects on prezygotic performance in plants: an argument for female choice. *Oikos* 68: 303–308.
- West-Eberhard, M.J. 1989. Phenotypic Plasticity and the origins of Diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20: 249-278.
- Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., Kirchhoff, L.V. 2011. *Advances in Parasitology Chagas Disease, Part A*, Academic Press imprint Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Whitlock, M.C., y McCauley, D.E. 1998. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm+1)$. *Heredity* 82: 117-125.
- Wigginton, J.E., Cutler, D.J., and Abecasis, G.R. 2005. A Note on Exact Tests of Hardy Weinberg Equilibrium. *American Journal of Human Genetics* 76: 887–893.
- Wigglesworth, V.B. 1974. *The Principles of Insect Physiology*, 7th ed., Chapman & Hall, London, 827 pp.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. T. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 87: 4576–4579.

- Wright, S. 1930. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16:97-158.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28:114-138.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*, vol. 4, Variability within and among natural populations. Chicago, IL: University of Chicago Press, pp 580.
- WHO. 2002. Control of Chagas disease. Second report of the WHO expert committee. WHO technical report series, WHO, Ginebra, Suiza.
- Yadón, Z.E., R.E. Gürtler, F. Tobar, A.C. Medici. 2006. La descentralización en el sector salud y el control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. *Descentralización y Gestión del Control de las Enfermedades Transmisibles en América Latina*. OPS, Buenos Aires. Argentina.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M. S., Sánchez, H., Adamson, S., Miles, G. A., López, E. González, N., Patterson, J. S., Gaunt, m. W., de Arias, A. R. and Miles, M. A. 2005. Origins of Chagas Disease: Didelphis species are natural host of *Trypanosoma cruzi* I and armadillo's host of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal of Parasitology* 35: 225-233.
- Zarate, L.G. 1983. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera: Reduviidae) in México. III. Completion of the life cycle adult longevity and egg production under optimal eeding conditions. *Journal Medical Entomology* 20: 485-97.
- Zeledón, R., Alvaro, R., Jirón, L.F. 1977. Observations on the feeding and defecation patterns of three Triatominae species (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropical* 34: 65-77.
- Zeledón, R. 1983. Vectores de la enfermedad de Chagas y sus características eco-fisiológicas. *Inter ciencia* 8: 384-395.
- Zeledón, R., Marín, F., Calvo, N., Lugo, E., Valle, S. 2006. Distribution and ecological aspects of *Rhodnius pallescens* in Costa Rica and Nicaragua and their epidemiological implications *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 75-79.
- Zhang, L.B., Comes, H. P., Kadereit, J. W. 2001. Phylogeny and quaternary history of the european montane/alpine endemic *Soldanella* (PRIMULACEAE) based on ITS and AFLP variation. *American Journal of Botany* 88: 2331-2345.

8.FIGURAS

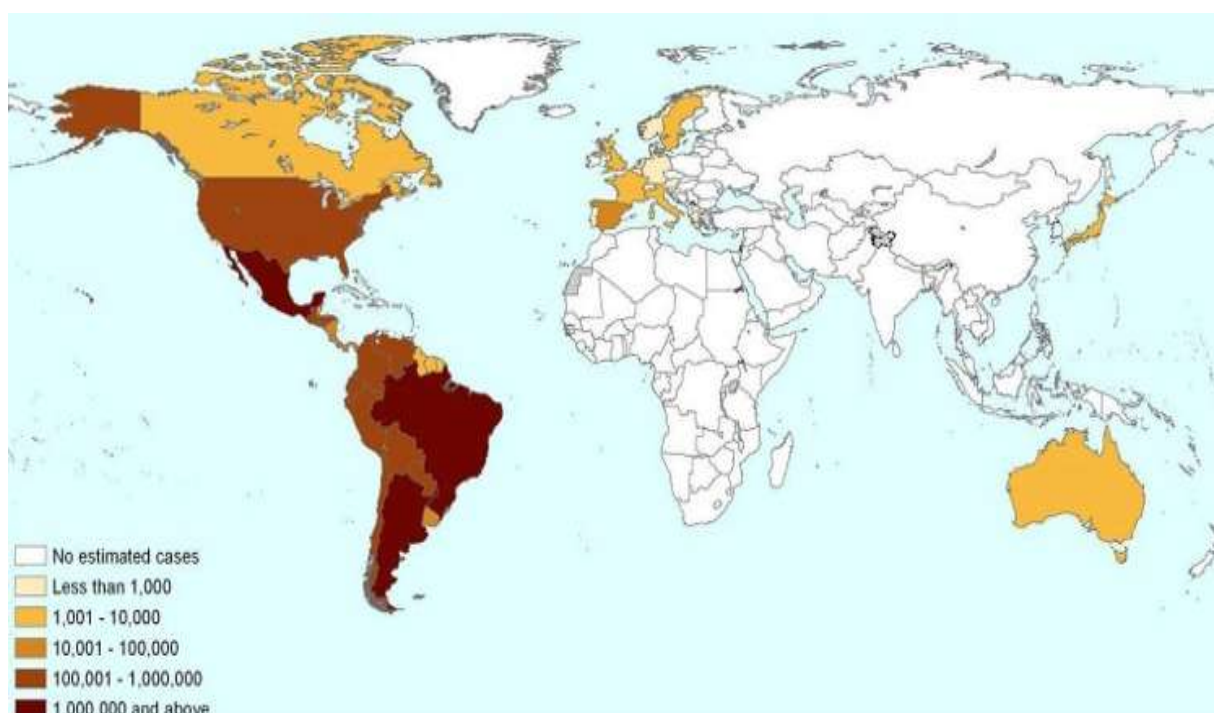


Figura 1. Mapa de riesgo de la transmisión de la Enfermedad de Chagas (ECh) a nivel Mundial (DNDi- Drugs for Neglected Diseases, 2009).

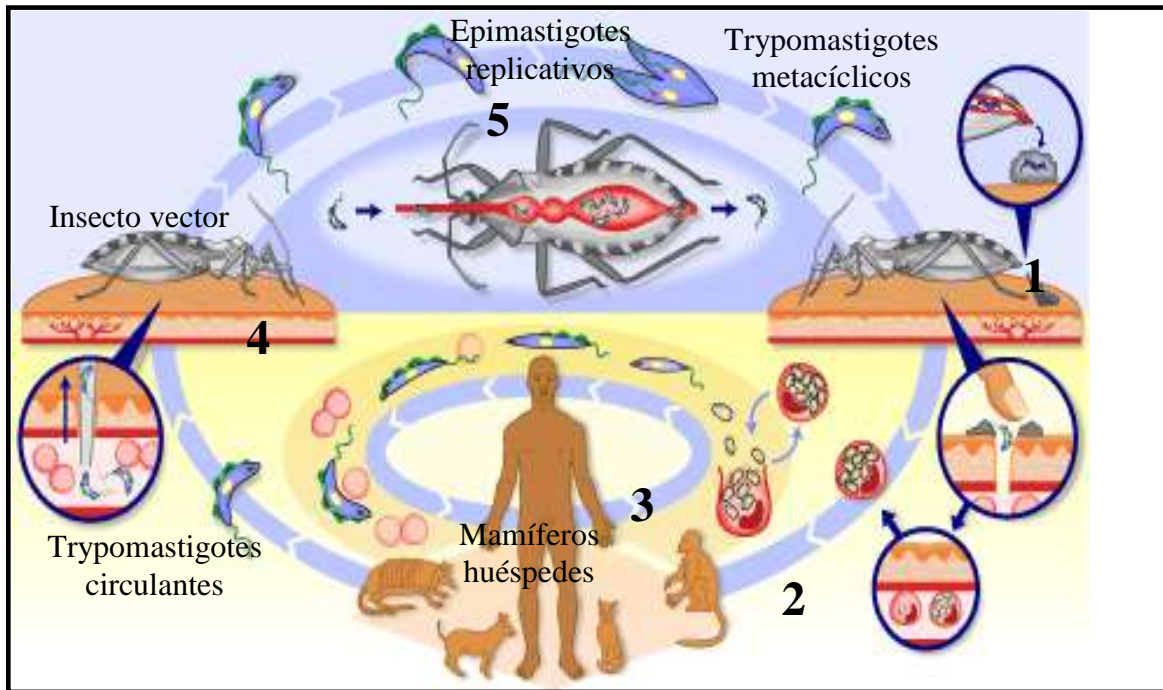
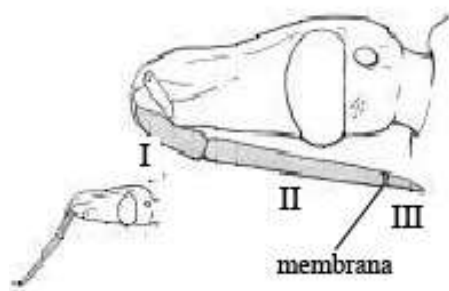
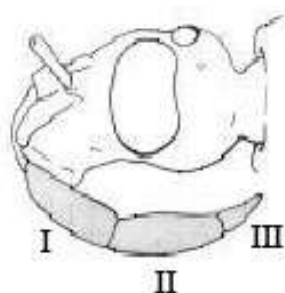


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* en el insecto vector y en el vertebrado mamífero (modificado de OMS/TDR [www.who.int/tdr/], 2011).

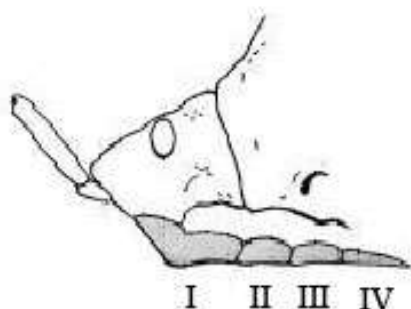
- 1.- Heces contaminadas con *Trypanosoma cruzi* ingresan al torrente sanguíneo del hospedero.
- 2.- Las formas infectivas ingresan a las células y se pasan al estadio amastigote.
- 3.- Los amastigotes se replican dentro de la célula y evolucionan a tripomastigotes sanguíneos que son liberados al torrente sanguíneo.
- 4.- Los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el vector cuando se alimentan de mamíferos infectados.
- 5.- Los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del vector y se replican, luego migran a la parte posterior del intestino y se transforman en tripomastigotes metacíclicos (la forma infectiva del parásito).



- **Hematófago:** Rostro recto y relativamente estrecho, dividido en tres segmentos (I, II, y III). Una membrana que permite desplegarse hacia arriba y adelante cuando el insecto está alimentándose

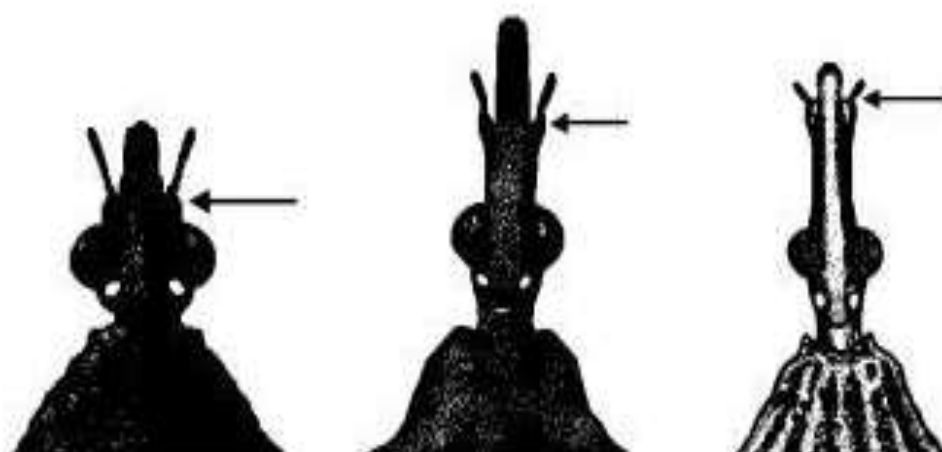


- **Depredador:** Rostro robusto y curvado, compuesto por tres segmentos (I, II y III).



- **Fitófago:** Rostro recto, estrecho, muy largo y dividido en cuatro segmentos (I, II, III y IV).

Figura 3. Aparatos bucales.- Comparación de los aparatos bucales dependiendo del tipo de alimentación (Abad-Franch *et al.*, 2001a).



Panstrongylus

Triatoma

Rhodnius

Figura 4. Comparación de las cabezas de los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*. Las flechas indican el lugar de nacimiento de las antenas, característica fundamental para la diferenciación entre géneros (Abad-Franch *et al.*, 2001a).



Figura 5. Largo del cuerpo (mm) de hembras de *Rhodnius ecuadoriensis* de las Provincias de Loja y Manabí. Hembras de Loja ($14,72 \pm 0,39$ mm) son más pequeñas que las hembras de Manabí ($16,59 \pm 0,32$ mm).

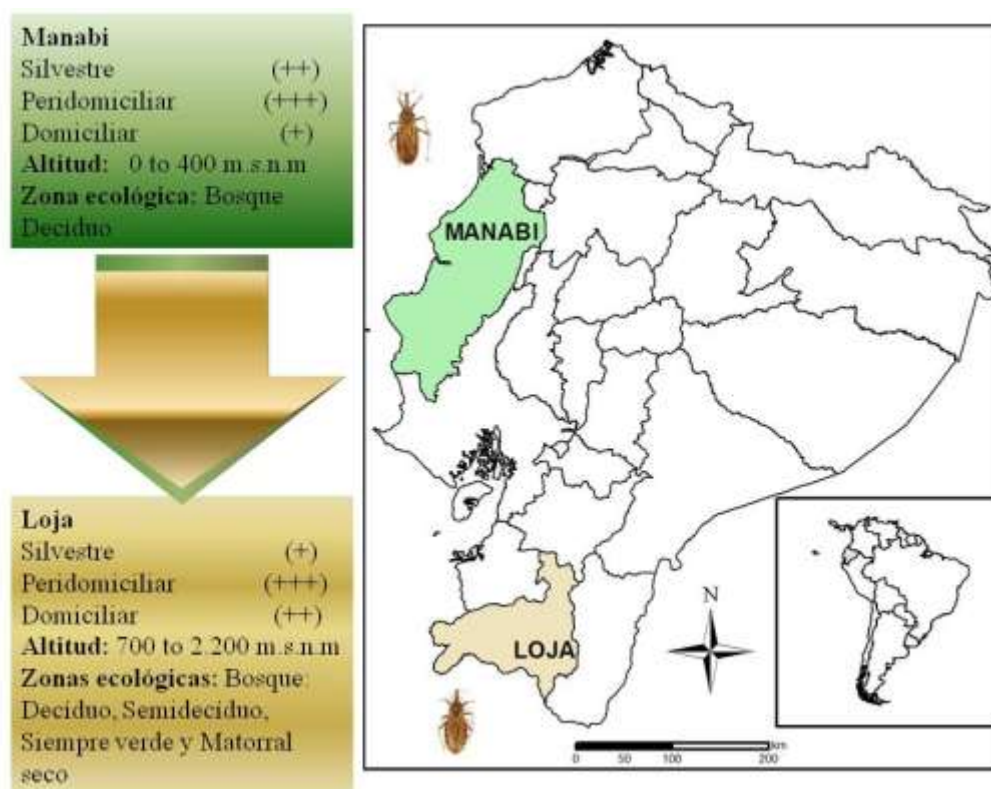


Figura 6. Mapa de las provincias (Manabí: Centro-Costa) y (Loja: Sur-Andina), en las que se recolectaron los especímenes de *Rhodnius ecuadoriensis*. Las (+++) indica el hábitat con mayor cantidad de especímenes recolectados en las dos regiones, a diferencia que (+) enseña el hábitat con menor cantidad de especímenes de *R. ecuadoriensis* recolectados.

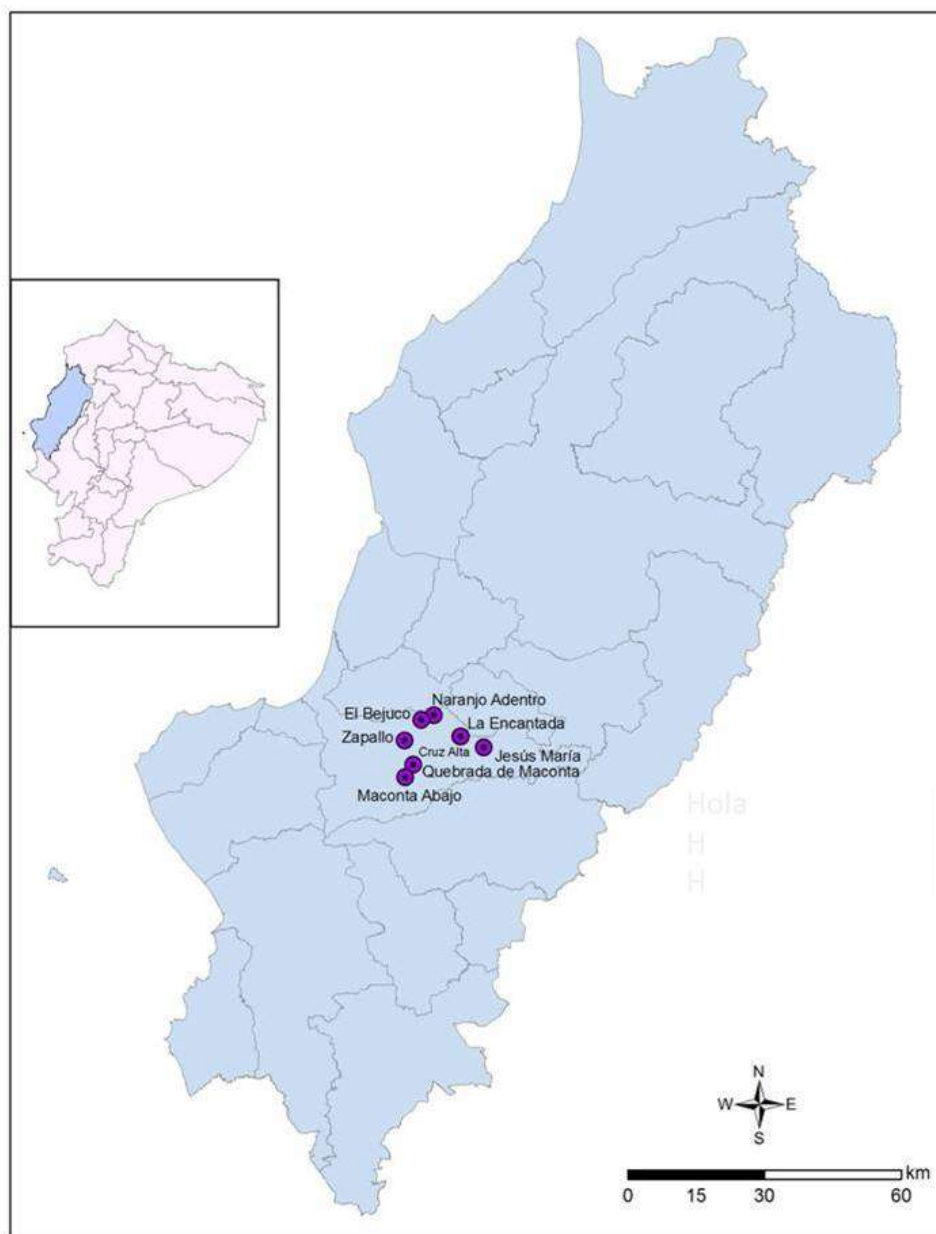


Figura 7. Mapa de la provincia de Manabí (Centro-Costa), indicando la localización de las comunidades en las que se recolectaron los especímenes de *Rhodnius ecuadoriensis*. Mapa: César Yumiseva (CIEI).

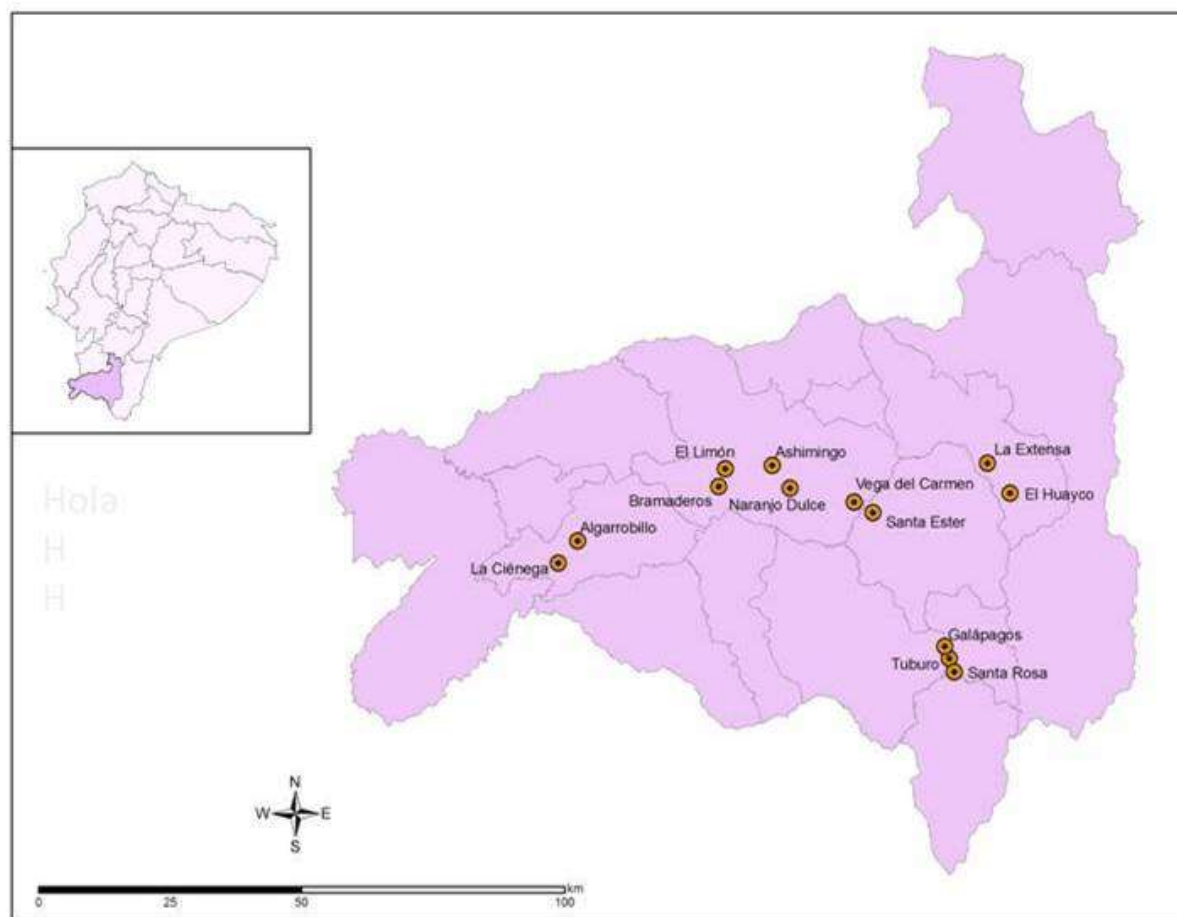


Figura 8. Mapa de la provincia de Loja (Sur- Andina), indicando la localización de las comunidades en las que se recolectaron los especímenes de *Rhodnius ecuadoriensis*.

Mapa: César Yumiseva (CIEI).



A.



B.



C.



D.



E.

Figura 9. Recolección de Triatominos en el hábitat sinantrópico (domicilio y peridomicilio): El procedimiento se inicia con **A.** Firma del consentimiento informado, la encuesta de vivienda y entomológica; toma de puntos GPS y fotos de la vivienda. **B.** Búsqueda en el hábitat domiciliar, **C.** Búsqueda en el hábitat peridomiciliar. En el caso de encontrar Triatominos vivos en la vivienda (infestada) **D.** se procede el rociamiento con insecticida. **E.** se realiza la charla educativa a toda la familia, se entrega el calendario, se coloca detrás de la puerta la ficha de visita, y se entrega un frasco etiquetado. **Fotos:** archivo CIEI.



Figura 10. Recolección de Triatominos en el hábitat silvestre. A - B. palmeras y árboles, C - D. madrigueras, E. troncos huecos. F- G. nidos de mamíferos y aves. G. Ardillas juveniles

Fotos: archivo CIEI.

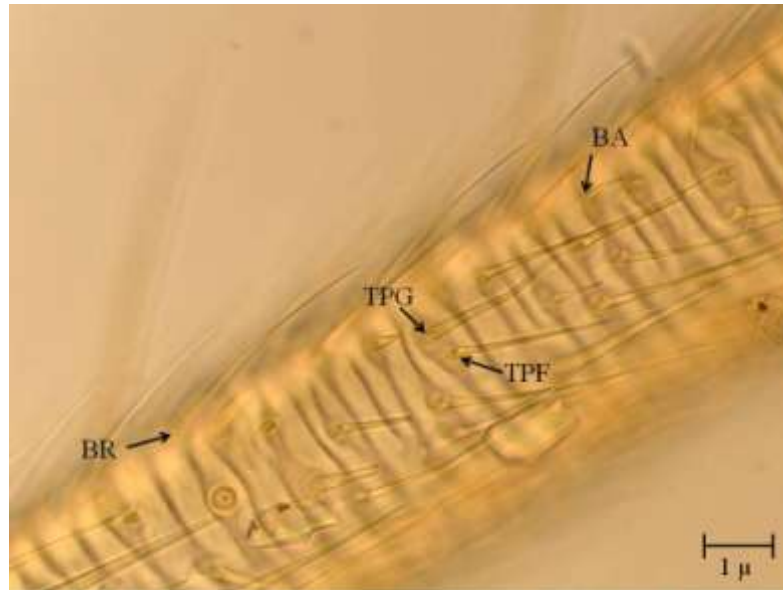


Figura 11. Tipo de sensilla antenal en cada segmento de la antena de *R. ecuadoriensis*. Bristles (BR), Thin-walled trichoidea o Tricoide a pared delgada (TPF), Thick-walled trichoidea o Tricoidea de pared gruesa (TPG) and basiconic o basicónica (BA), 400 X



Figura 12. Vista dorsal del hemiélitro o ala derecha de *R. ecuadoriensis*. Los puntos amarillos indican los landmarks o puntos de referencia que se utilizaron para el análisis de morfometría geométrica (MG). A continuación se detallan los puntos de acuerdo a las uniones de las nerviaciones, 40X.

1. Entrecruzamiento entre la postcubital y primera anal.
2. Entrecruzamiento entre la vena cubital y post cubital.
3. Entrecruzamiento entre la vena radial media y la cubital.
4. Entrecruzamiento entre la vena
5. Entrecruzamiento entre la vena radial media y radial.
6. Entrecruzamiento entre la vena radial y la subcosta.
7. Entrecruzamiento entre la vena
8. Entrecruzamiento entre la vena cubital y postcubital.

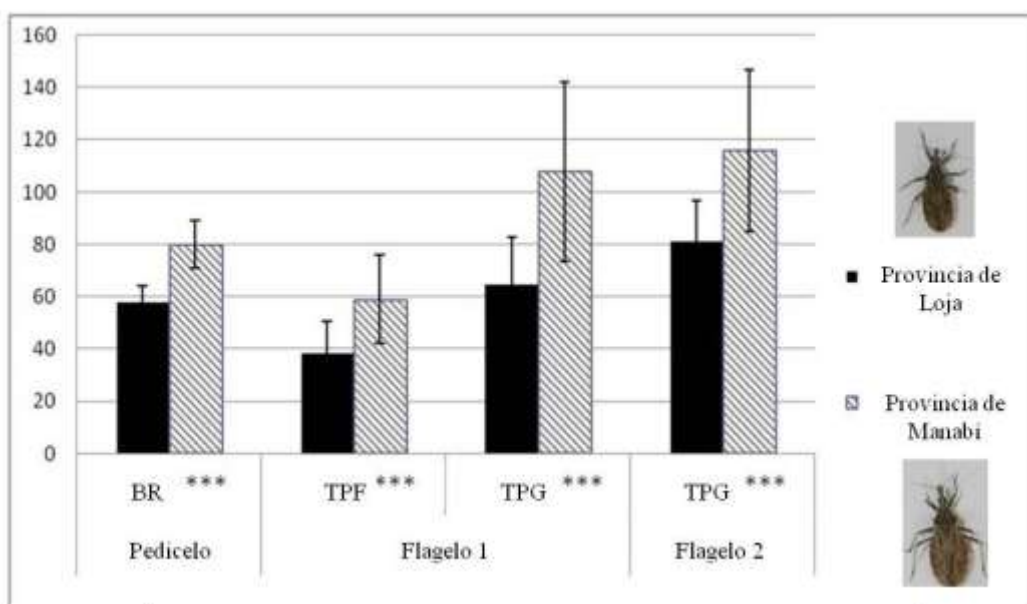


Figura 13. Ilustración en barras de la variación geográfica de fenotipo antenal de poblaciones *R. ecuadoriensis* (machos y hembras) recolectados en Loja y Manabí.

Significación: (*) $p < 0.005$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

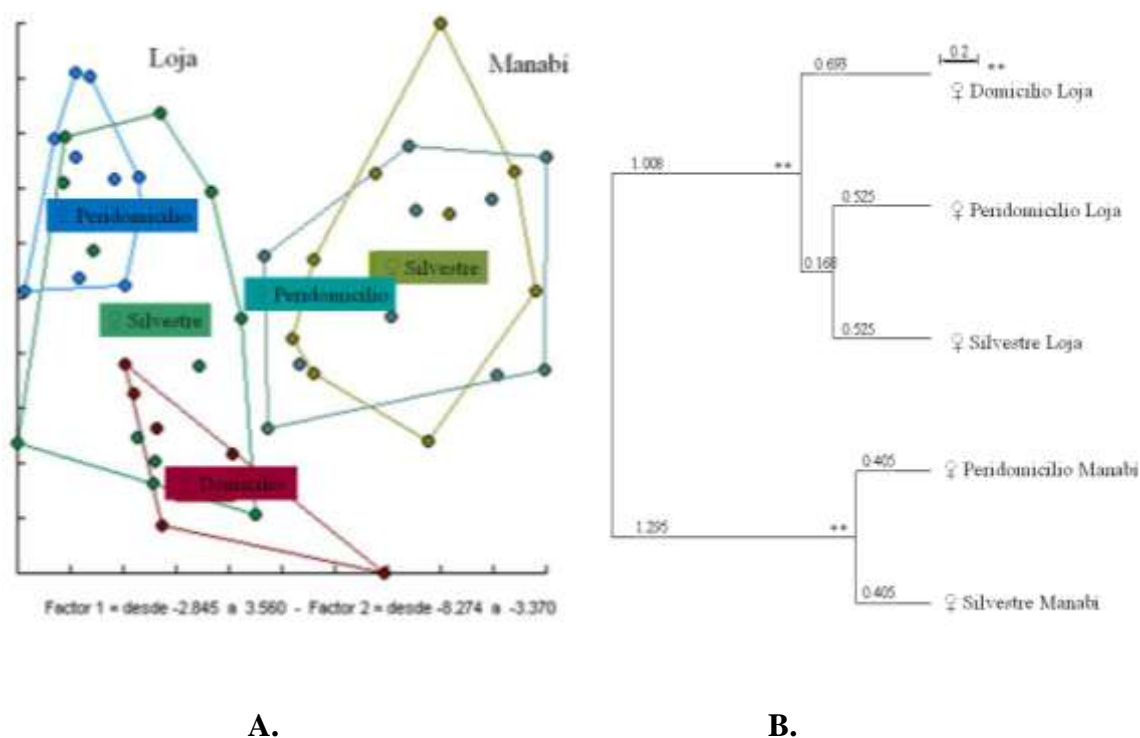


Figura 14. Variación a nivel geográfico y por hábitat de fenotipo antenal de hembras de *Rhodnius ecuadoriensis* en las dos provincias. A. Análisis Discriminante que demuestra las diferencias entre hembras de *R. ecuadoriensis* entre las dos provincias (Manabí y Loja). **B. Dendrograma** de las Distancias Fenéticas derivadas de las distancias de Mahalanobis obtenidas al comparar hembras de *R. ecuadoriensis* colectadas en las dos provincias (Manabí y Loja) y por hábitat.

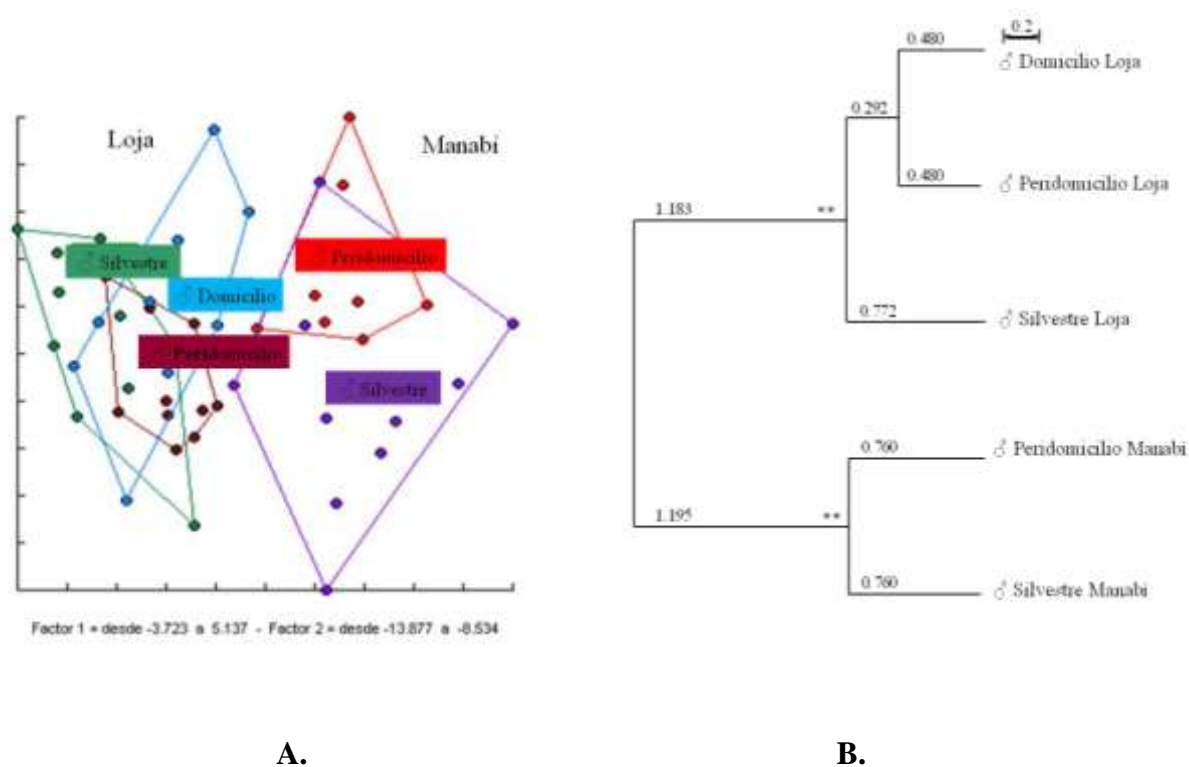
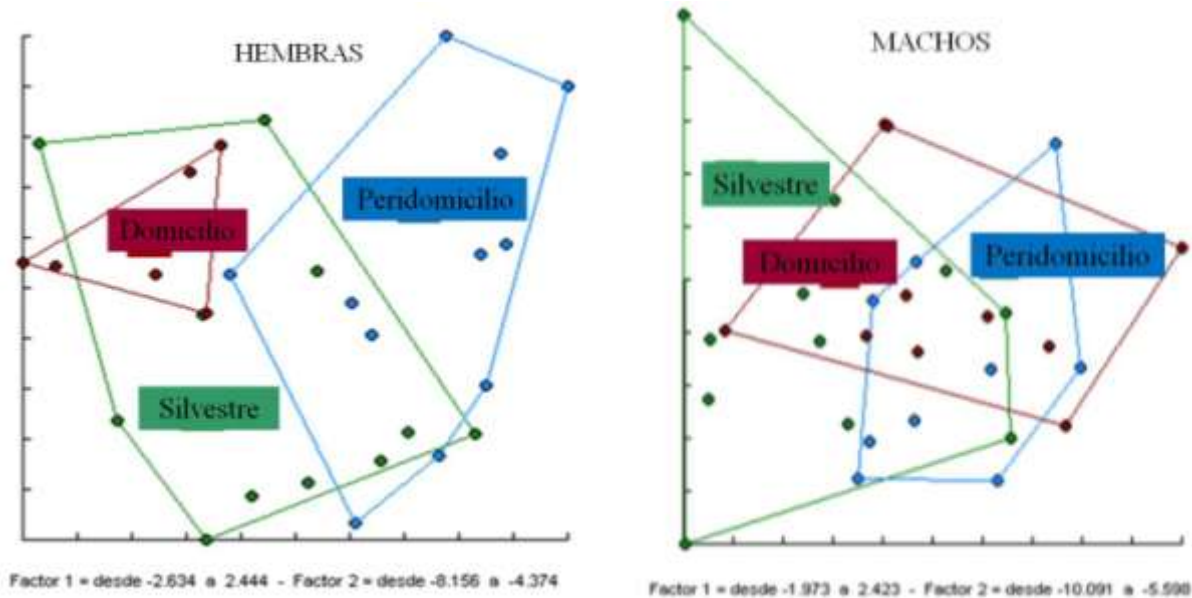


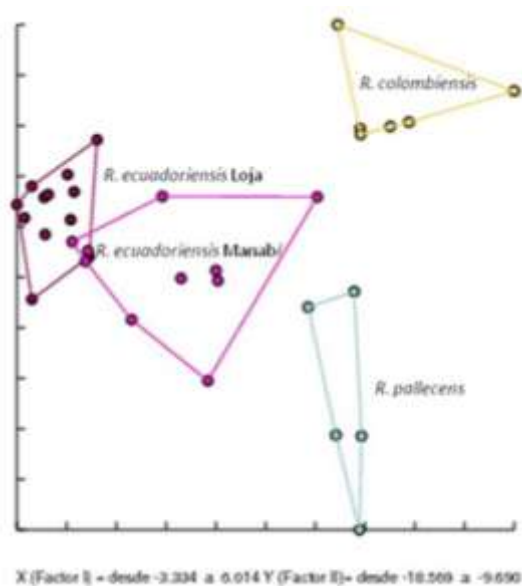
Figura 15. Variación a nivel geográfico y por hábitat del fenotipo antenal de machos de *Rhodnius ecuadoriensis* en las dos provincias. A. Análisis Discriminante que demuestra las diferencias entre machos de *R. ecuadoriensis* entre las dos provincias (Manabí y Loja). **B. Dendrograma** de las Distancias Fenéticas derivadas de las distancias de Mahalanobis obtenidas al comparar machos de *R. ecuadoriensis* colectadas en las dos provincias (Manabí y Loja) y por hábitat.



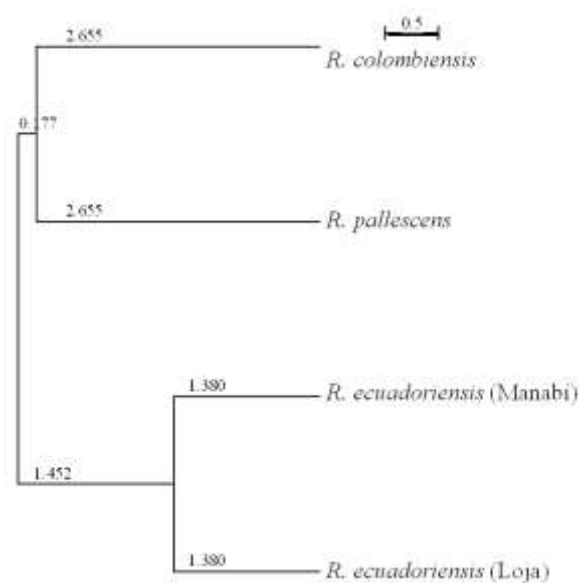
A.

B.

Figura 16. Dimorfismo sexual de fenotipo antenal de poblaciones de *R. ecuadoriensis* en las provincias de Loja (hembras y machos). Análisis Discriminante: A. Hembras B. Machos.



A.



B.

Figura 17. A. Análisis Discriminante entre hembras del hábitat silvestre de *Rhodnius ecuadoriensis* (Manabí y Loja) *R. pallens* y *R. colombiensis*. **B. Dendrograma** UPGMA de las Distancias Fenéticas derivadas de las distancias de Mahalanobis entre *Rhodnius ecuadoriensis*, *R. pallens* y *R. colombiensis* del hábitat silvestre.

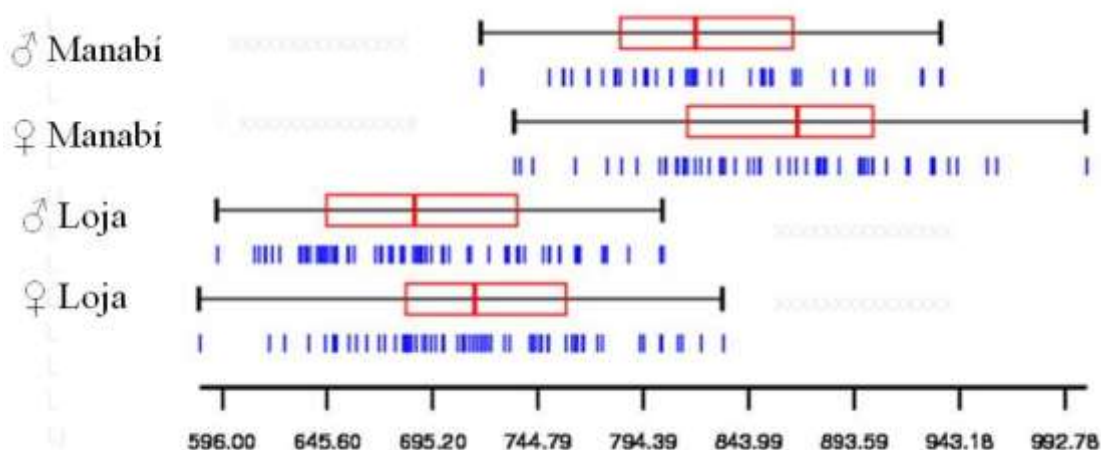
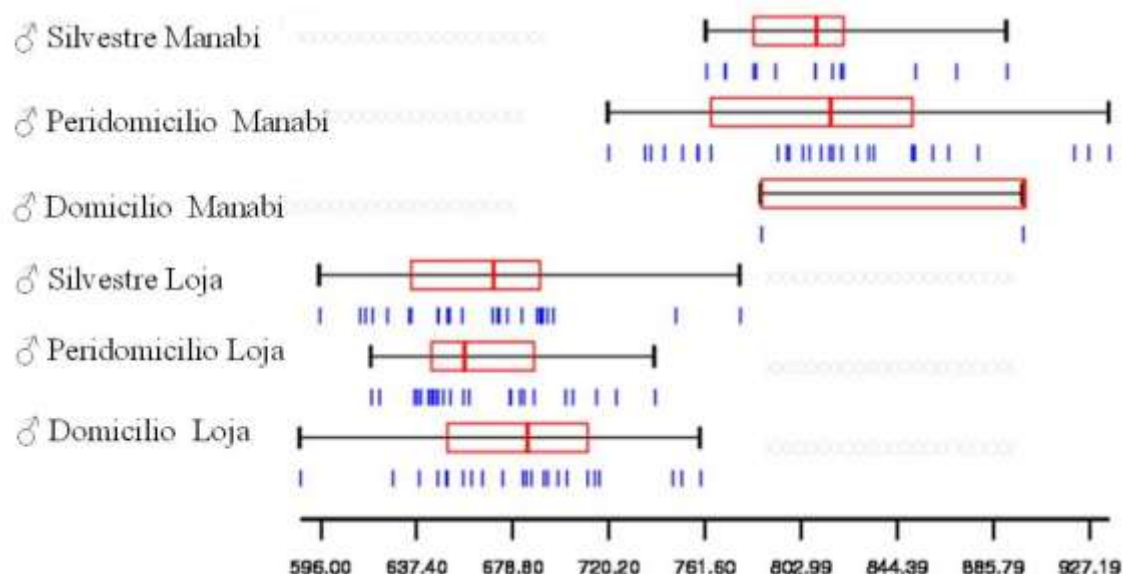
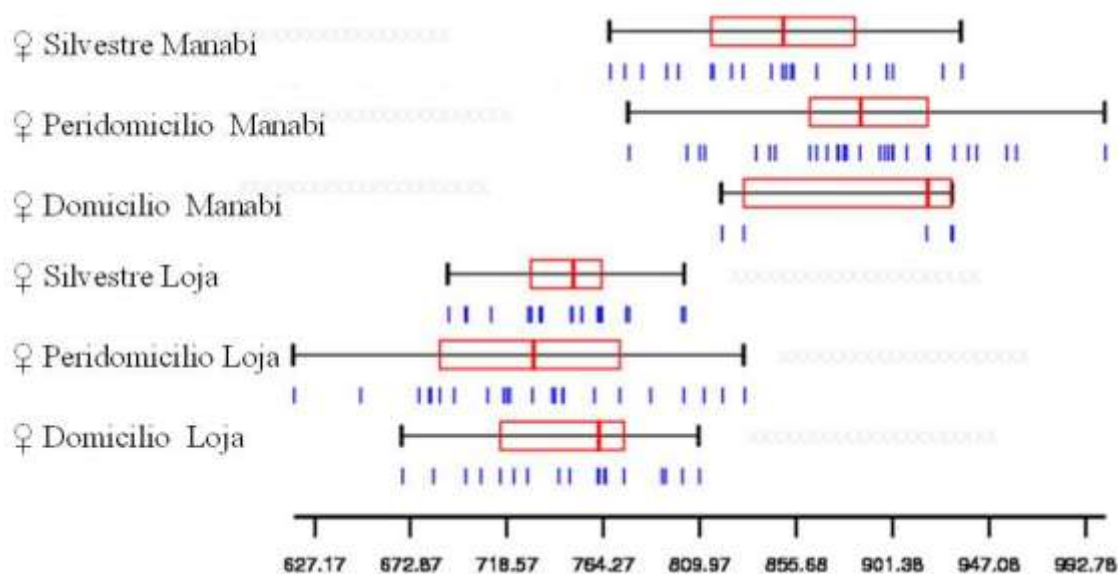


Figura 18. Variación geográfica y sexual en el tamaño (CS) del hemiélitro derecho de *R. ecuadoriensis*. La línea media (roja) “ ” representa la mediana del tamaño centroide de los hemiélitros derechos; en los extremos “ - ” representa los cuartiles (25 y 75), en azul “ ” representa los números de especímenes analizados en el estudio y en la parte inferior en negro se representa el rango en el que se distribuye el tamaño centroide entre las dos poblaciones y por sexo (macho y hembras).



A.



B.

Figura 19. Dimorfismo sexual en el tamaño del ala (CS) de *R. ecuadoriensis* tanto en Loja como en Manabí. La línea media (roja) “ ” representa la mediana del tamaño centroide de los hemiólitros derechos; en los extremos “ - ” representa los cuartiles (25 y 75), en azul “ ” representa los números de especímenes analizados en el estudio y en la parte inferior en negro se representa el rango en el que se distribuye el tamaño centroide entre **A.** machos y **B.** hembras de las dos regiones.

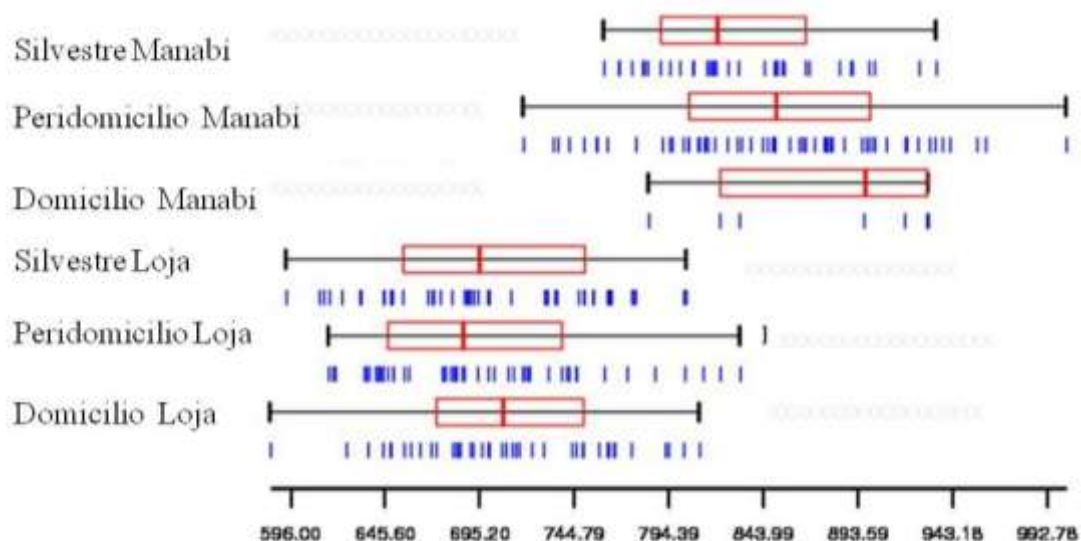


Figura 20. Variación en tamaño de ala (CS) de poblaciones *R. ecuadoriensis* por Hábitat en las provincias de Loja y Manabí. La línea media (roja) “ ” representa la mediana del tamaño centroide de los hemiélitros derechos; en los extremos “ - ” representa los cuartiles (25 y 75), en azul “ ” representa los números de especímenes analizados en el estudio y en la parte inferior en negro se representa el rango en el que se distribuye el tamaño centroide entre las subpoblaciones (machos y hembras juntos) de las dos regiones

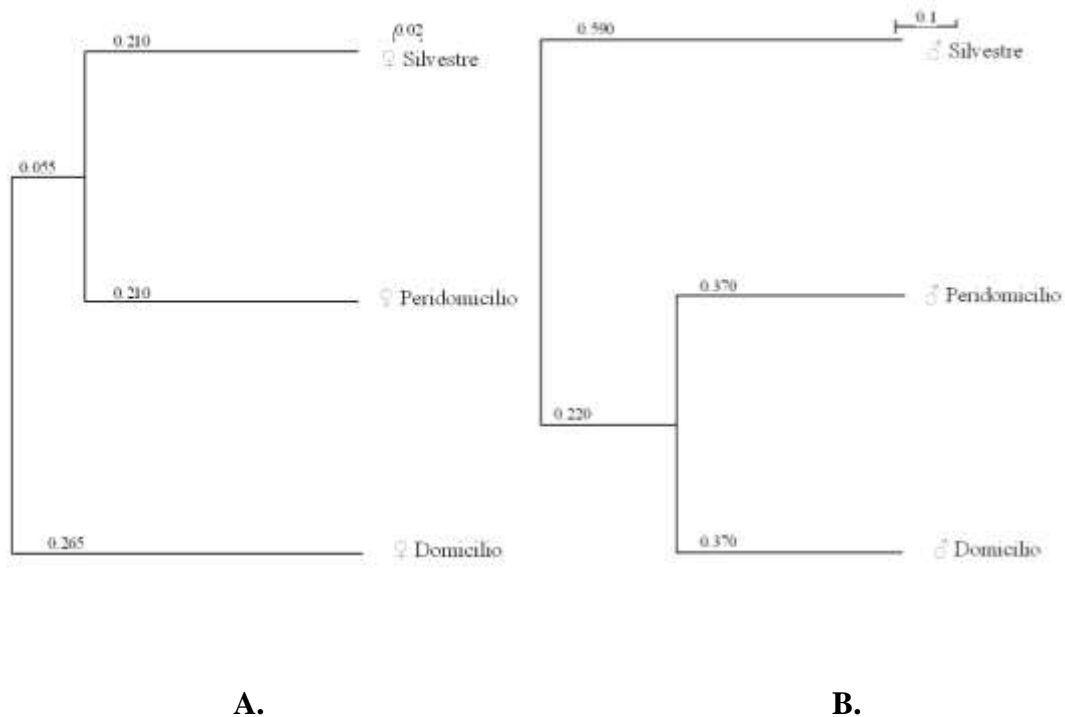


Figura 21. Loja Dendrograma UPGMA derivadas de las distancias de Mahalanobis.

A. Alas de Hembras (♀). **B.** Alas de Machos (♂) de *R. ecuadoriensis* de los hábitats domiciliar, peridomiciliar y silvestre.

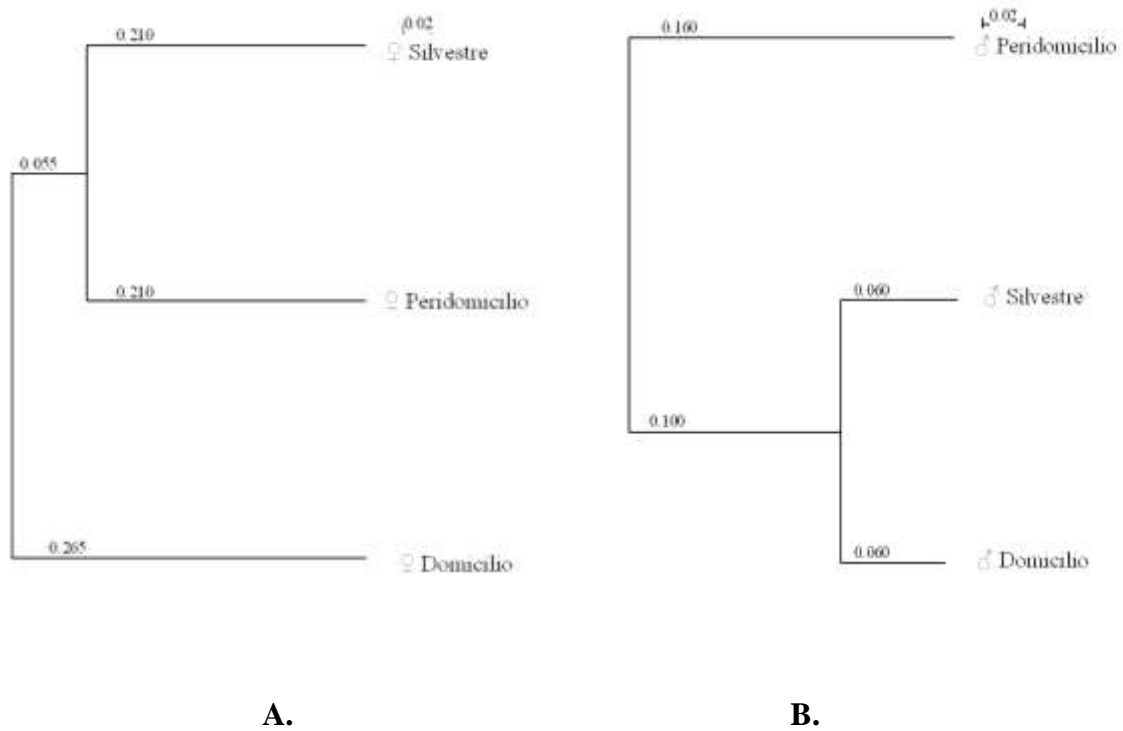


Figura 22. Manabí Dendrograma UPGMA derivadas de las distancias de Mahalanobis. A. Alas de Hembras (♀). B. Alas de Machos (♂) de *R. ecuadoriensis* de los hábitats domiciliar, peridomiciliar y silvestre.

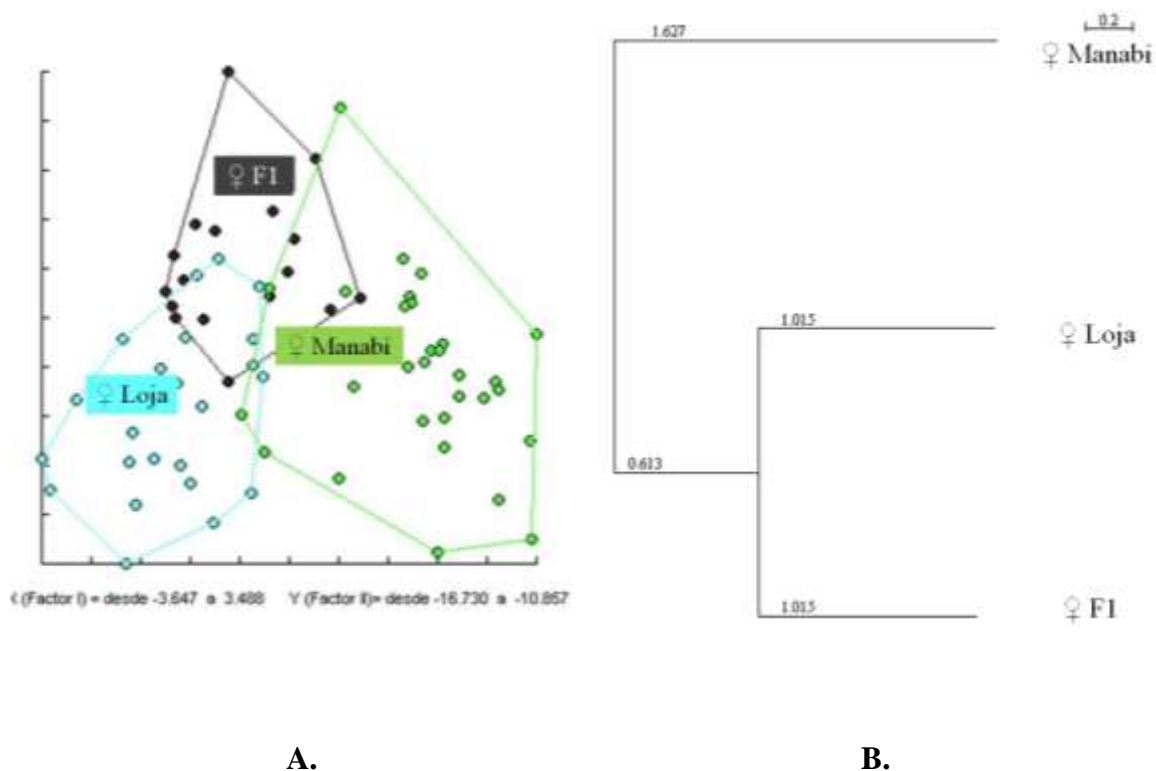


Figura 23. Primera Generación (F1): A. Análisis Discriminante: que demuestra las diferencias entre hembras de *R. ecuadoriensis* entre las dos provincias (Manabí y Loja) con las hembras (♀) obtenidas en durante el cruzamiento entre las dos poblaciones. **B. Distancias Fenéticas** Dendrograma derivadas de las distancias de Mahalanobis obtenidas al comparar hembras de *R. ecuadoriensis* colectadas en las dos provincias (Manabí y Loja) y en el cruzamiento.

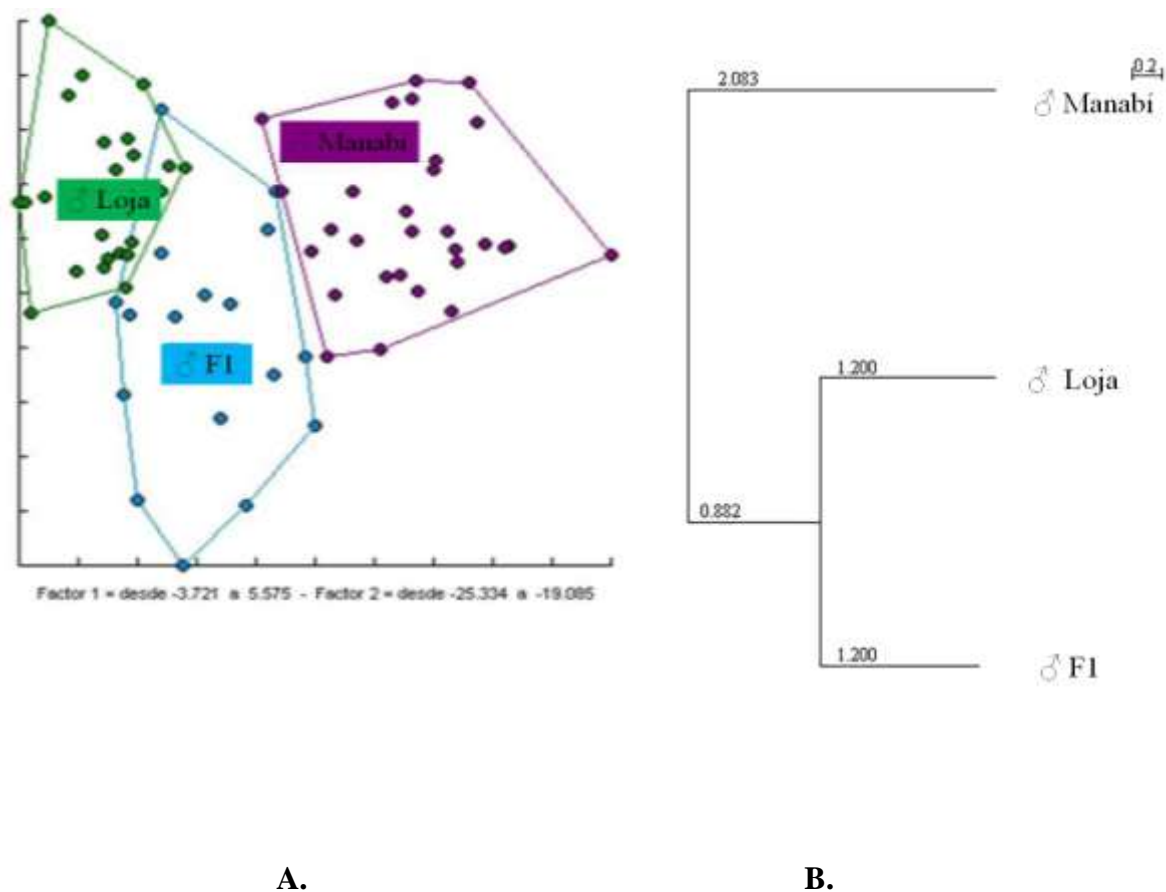


Figura 24. Primera Generación (F1): A. Análisis Discriminante: que demuestra las diferencias entre los machos (σ^7) de *R. ecuadoriensis* entre las dos provincias (Manabí y Loja) con las machos obtenidos en durante el cruzamiento entre las dos poblaciones. **B. Distancias Fenéticas:** Dendrograma derivadas de las distancias de Mahalanobis obtenidas al comparar machos de *R. ecuadoriensis* colectados en las dos provincias (Manabí y Loja) y en el cruzamiento.

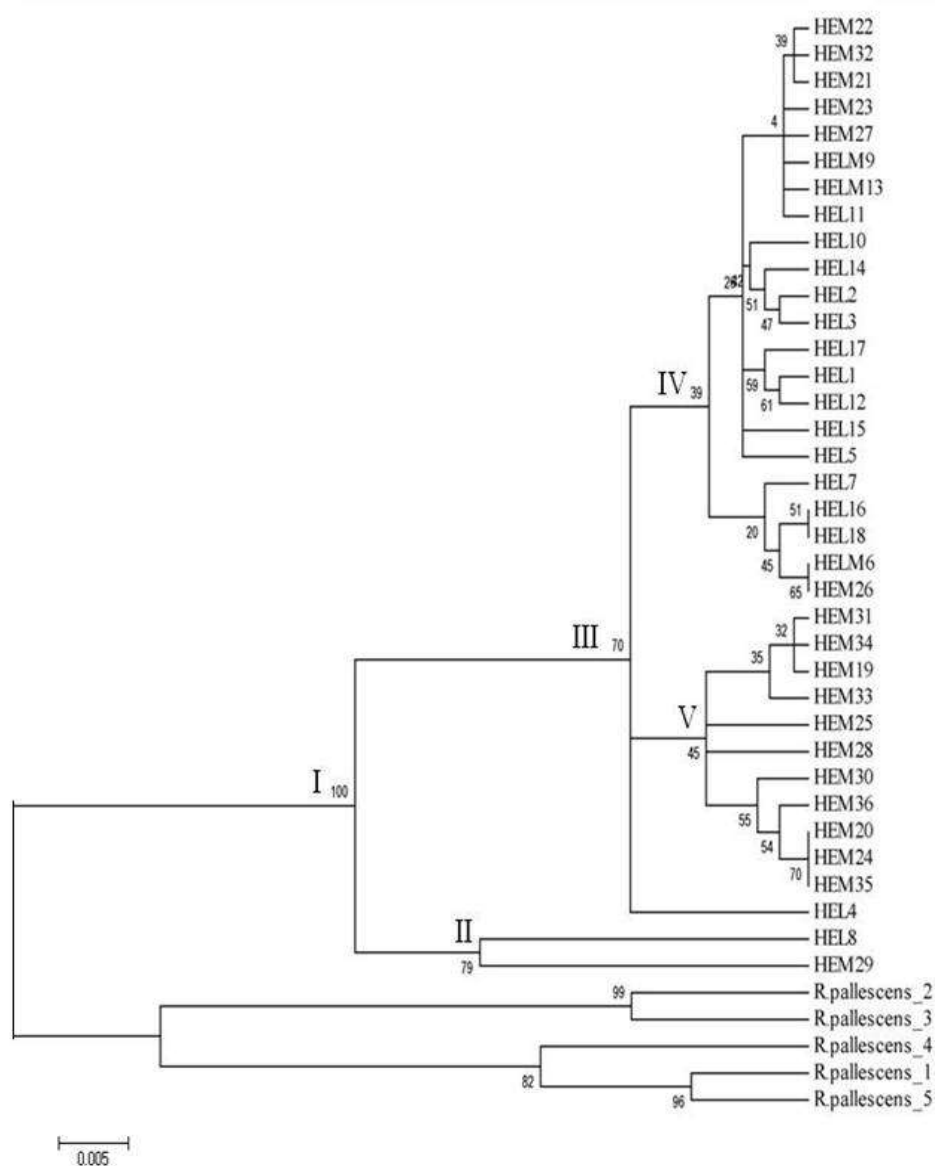


Figura 25. Dendrograma de Haplotipos obtenidos en las 168 muestras de *R. ecuadoriensis*. 36 Haplotipos obtenidos entre las dos poblaciones (15h Loja) y (18h Manabí); y tres haplotipos compartidos (HELM6, HELM9 y HEM13).

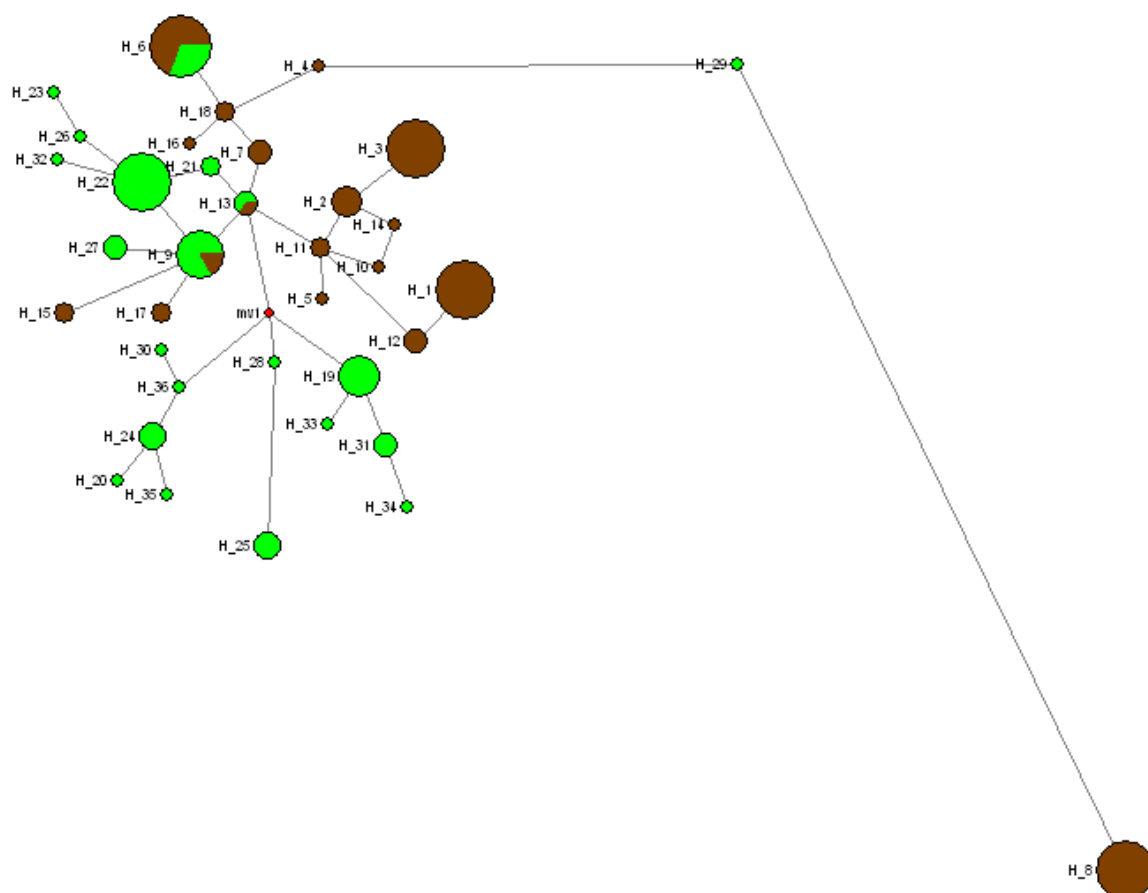
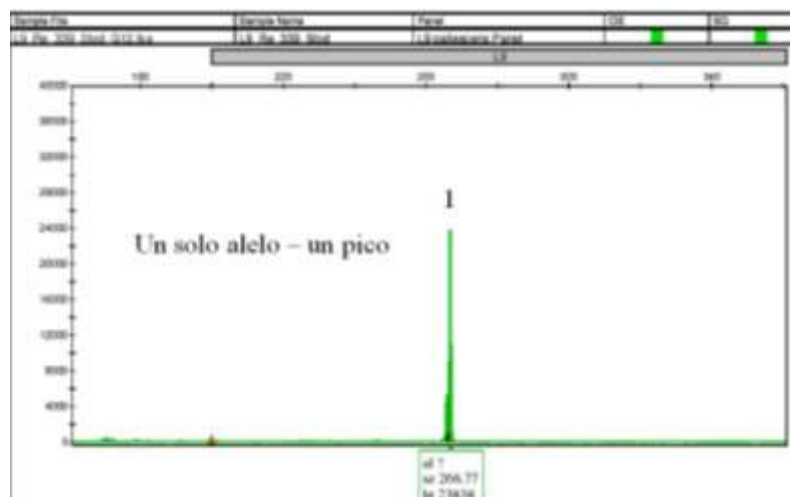
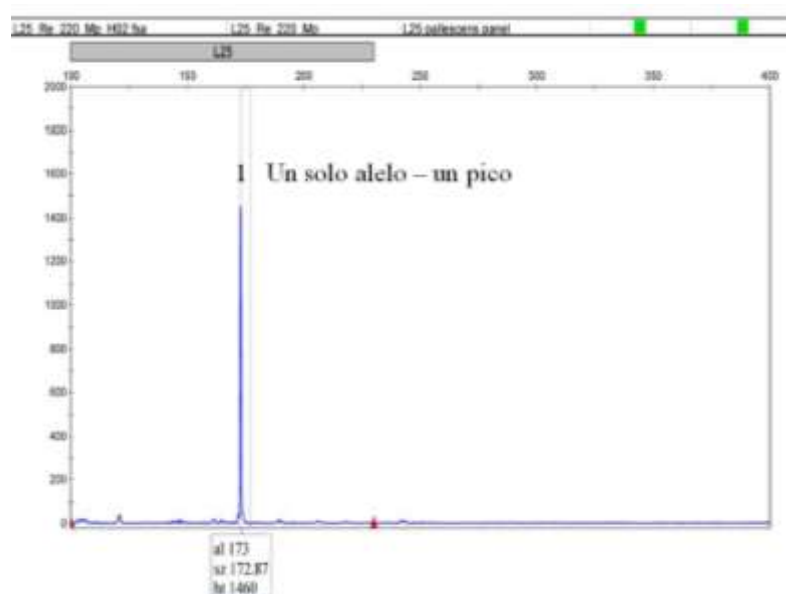


Figura 26. Red de Haplotipos obtenidos en las 168 muestras de *R. ecuadoriensis*. 36 Haplotipos obtenidos entre las dos provincias: 15 y 18 haplotipos exclusivos en Loja y en Manabí respectivamente; y tres compartidos (HELM6, HELM9 y HEM13). El diámetro del círculo es proporcional a la frecuencia de los haplotipos.

● Representa los haplotipos de Loja; ● Representa los haplotipos de Manabí. **mv** representa el ancestro hipotético.



A.



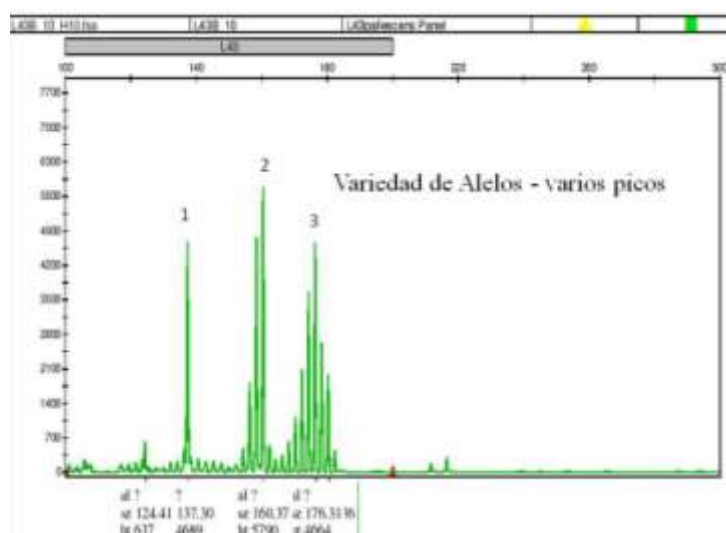
B.

Figura 27. Tamaño de los fragmentos en pares de bases (pb) en los locus L9 y L25.

Electroferogramas obtenidos por el GeneMapper™ v.4.0. **A.** L9 (267 pb); **B.** L25 (173 pb). Estos microsatélites presentaron un solo pico, un solo alelo, por este motivo se les consideraron como microsatélites monomórficos.



A.



B.

Figura 28. Tamaño de los fragmentos en pares de bases (pb) en los locus L3 y L43. Electroferogramas obtenidos por el GeneMapper™ v.4.0. **A.** L3 (86 – 164 pb); **B.** L43 (124 - 176 pb). Estos microsatélites presentaron variedad de alelos, picos no claros de difícil análisis.

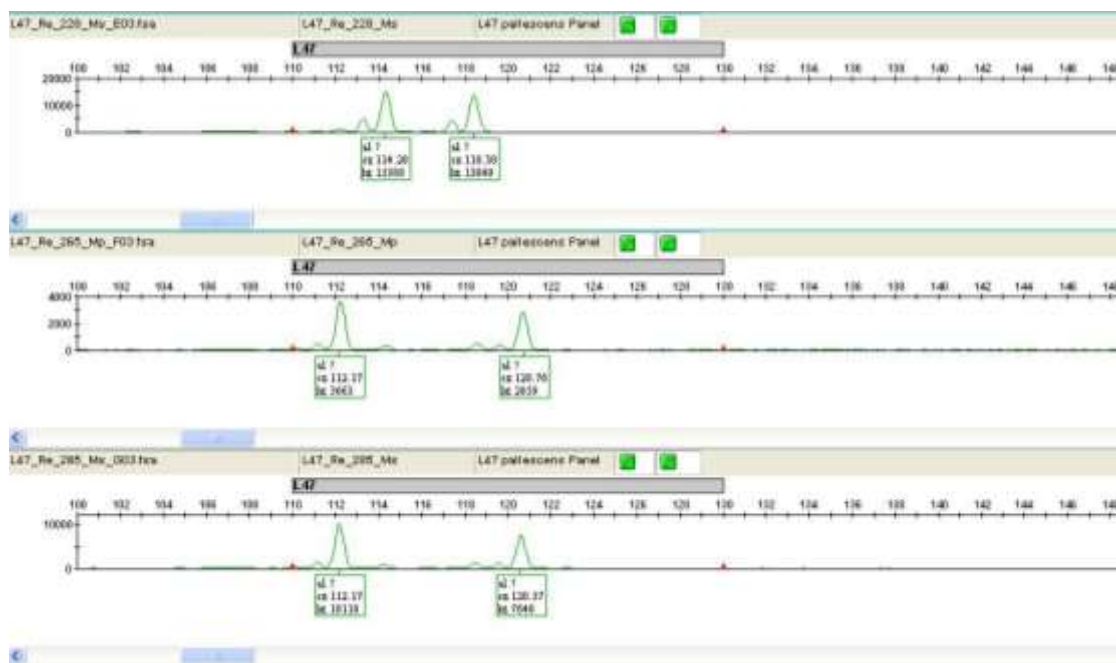
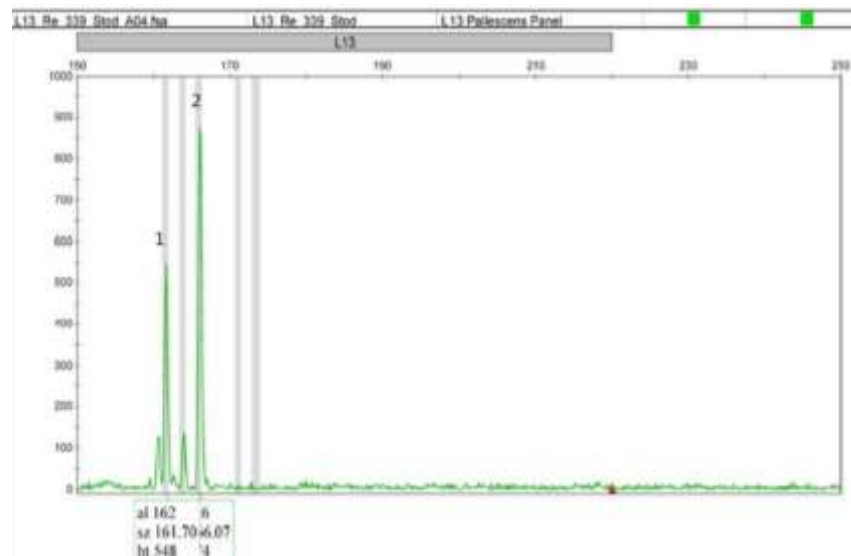
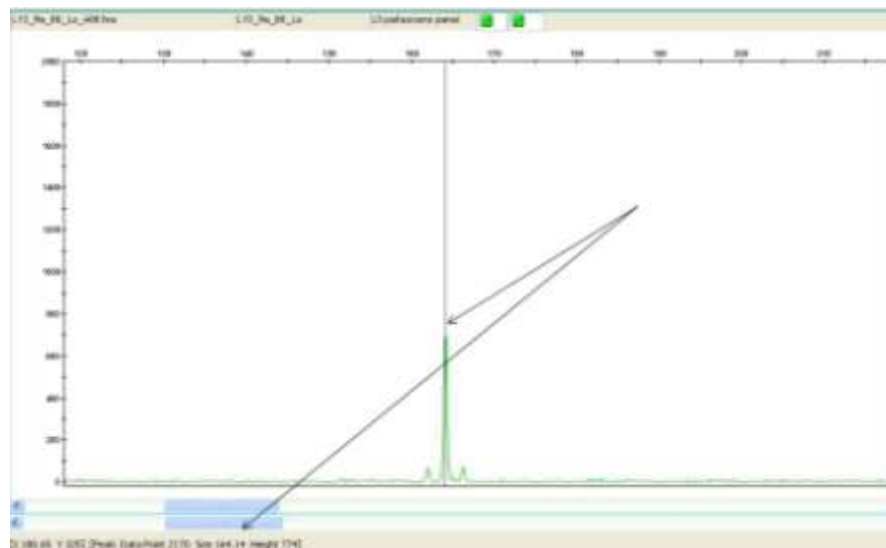


Figura 29. Tamaño de los fragmentos en pares de pares (pb) en los locus L47 (110-120 pb). Electroferogramas obtenidos por el GeneMapper™ v.4.0. Este microsatélite presentó picos claros (heterocigotos) y fue considerado para el estudio, debido a su polimorfismo.

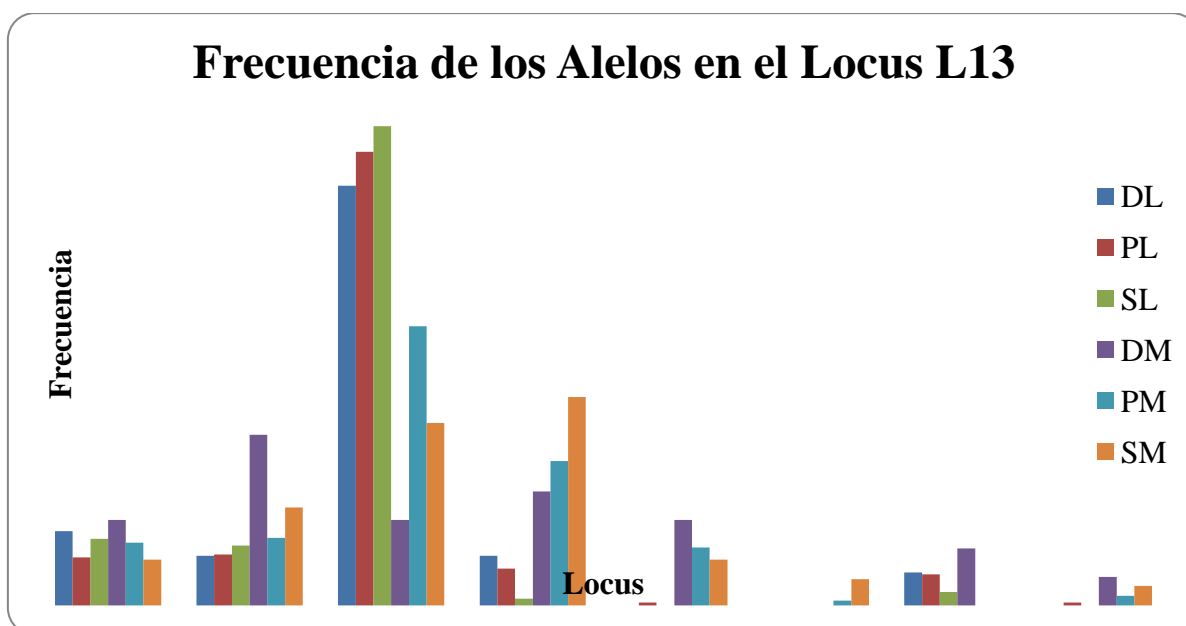


A.

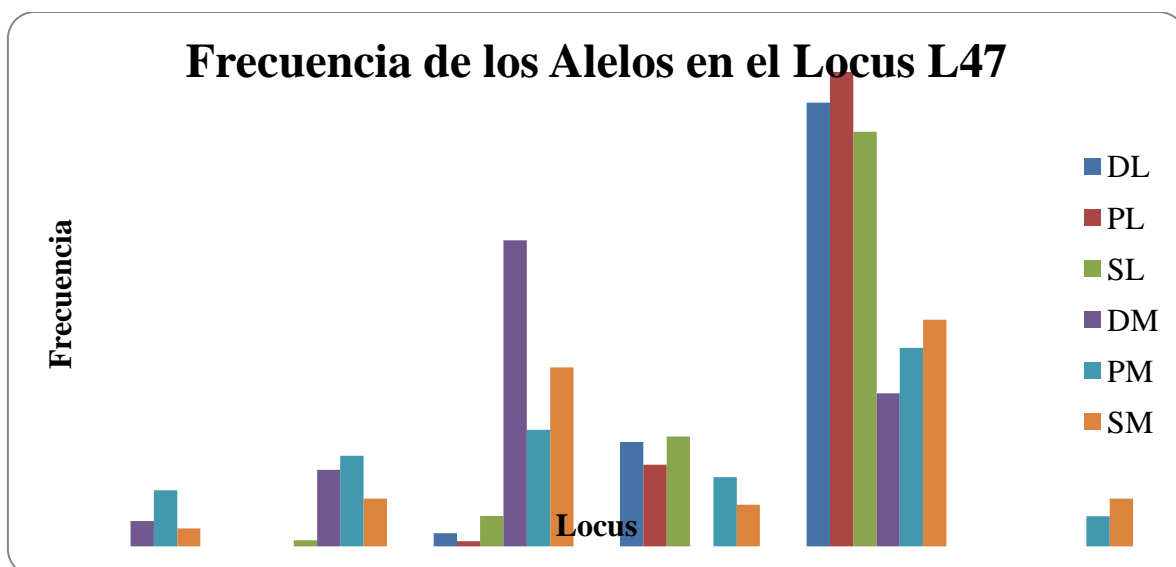


B.

Figura 30. Tamaño de los fragmentos en pares de pares (pb) en los locus L47 (160-174 pb). Electroferogramas obtenidos por el GeneMapper™ v.4.0. Este microsatélite presentó **A. dos picos claros (heterocigotos) y **B.** un tamaño del fragmento de 164 pb. Debido a su polimorfismo fue considerado para el estudio.**



A.



B.

Figura 31. Distribución de dos microsatélites (L13 y L47) polimórficos amplificados en los 333 especímenes de *R. ecuadoriensis*. Frecuencia alélica en el A. Locus L13 B. Locus L47 en los tres hábitats de las dos provincias.

Loja: DL: Domicilio - Loja; PL: Peridomicilio - Loja; SL: Silvestre - Loja.

Manabí: DM: Domicilio - Manabí; PM: Peridomicilio - Manabí; SM: Silvestre - Manabí.

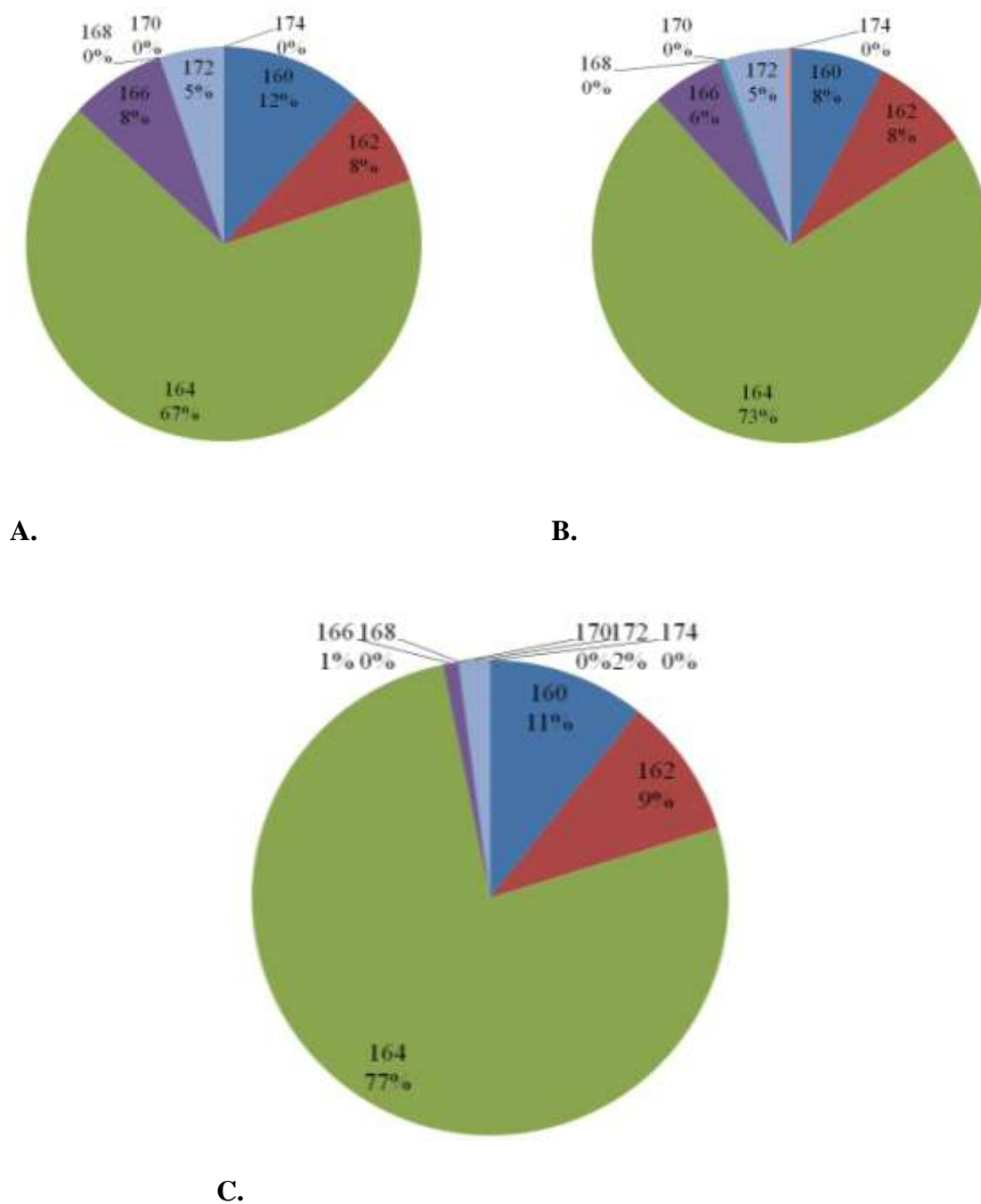


Figura 32. Frecuencia de Alelos obtenidos en el microsatélite L13 polimórfico de *R. ecuadoriensis* en los hábitats **A.** Domicilio. **B.** Peridomicilio y **C.** Silvestre de la provincia de Loja.

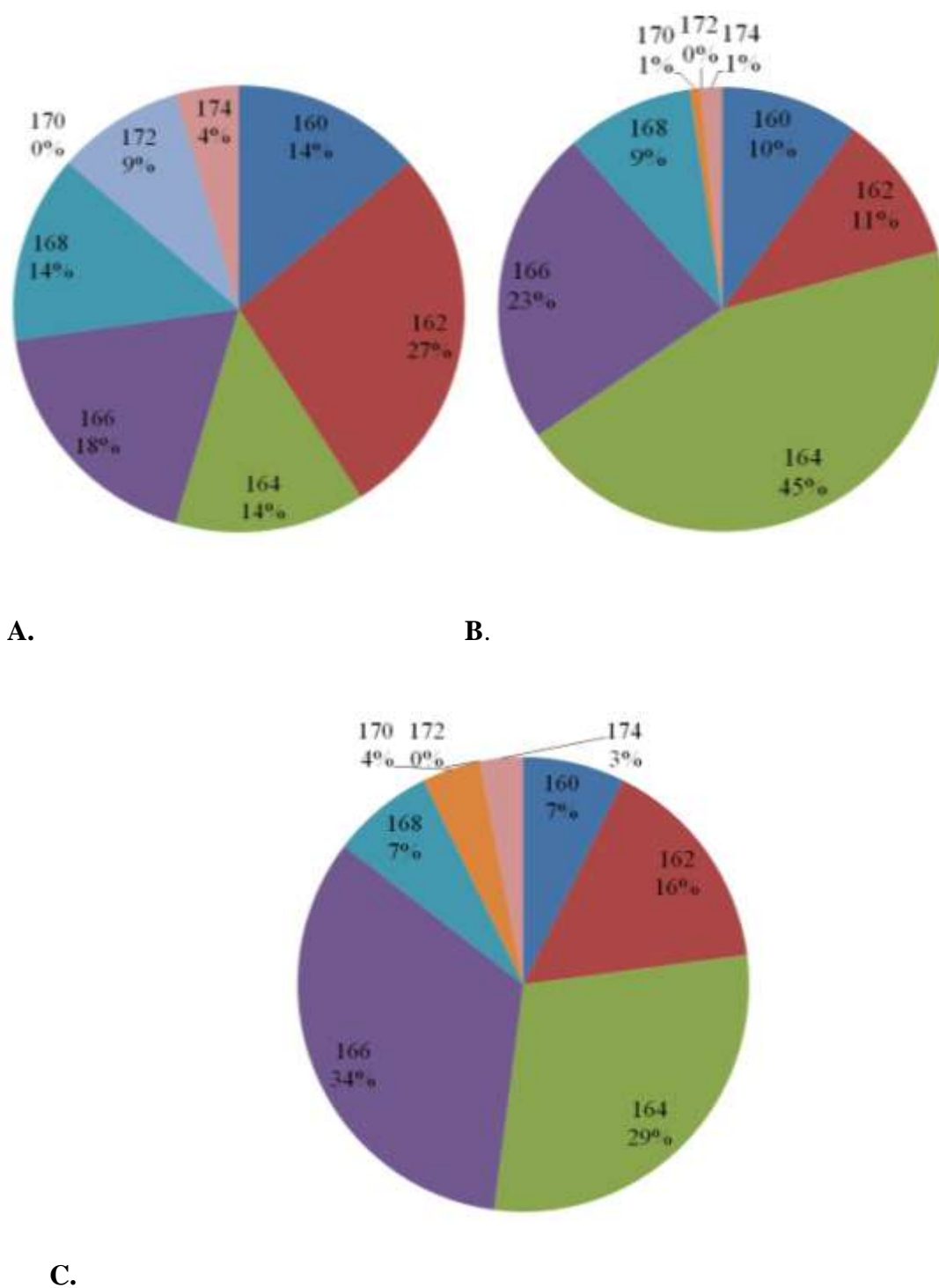


Figura 33. Frecuencia de Alelos obtenidos en el microsatélite L13 polimórfico de *R. ecuadoriensis* en los hábitats A. Domicilio B. Peridomicilio y C. Silvestre de la provincia de Manabí.

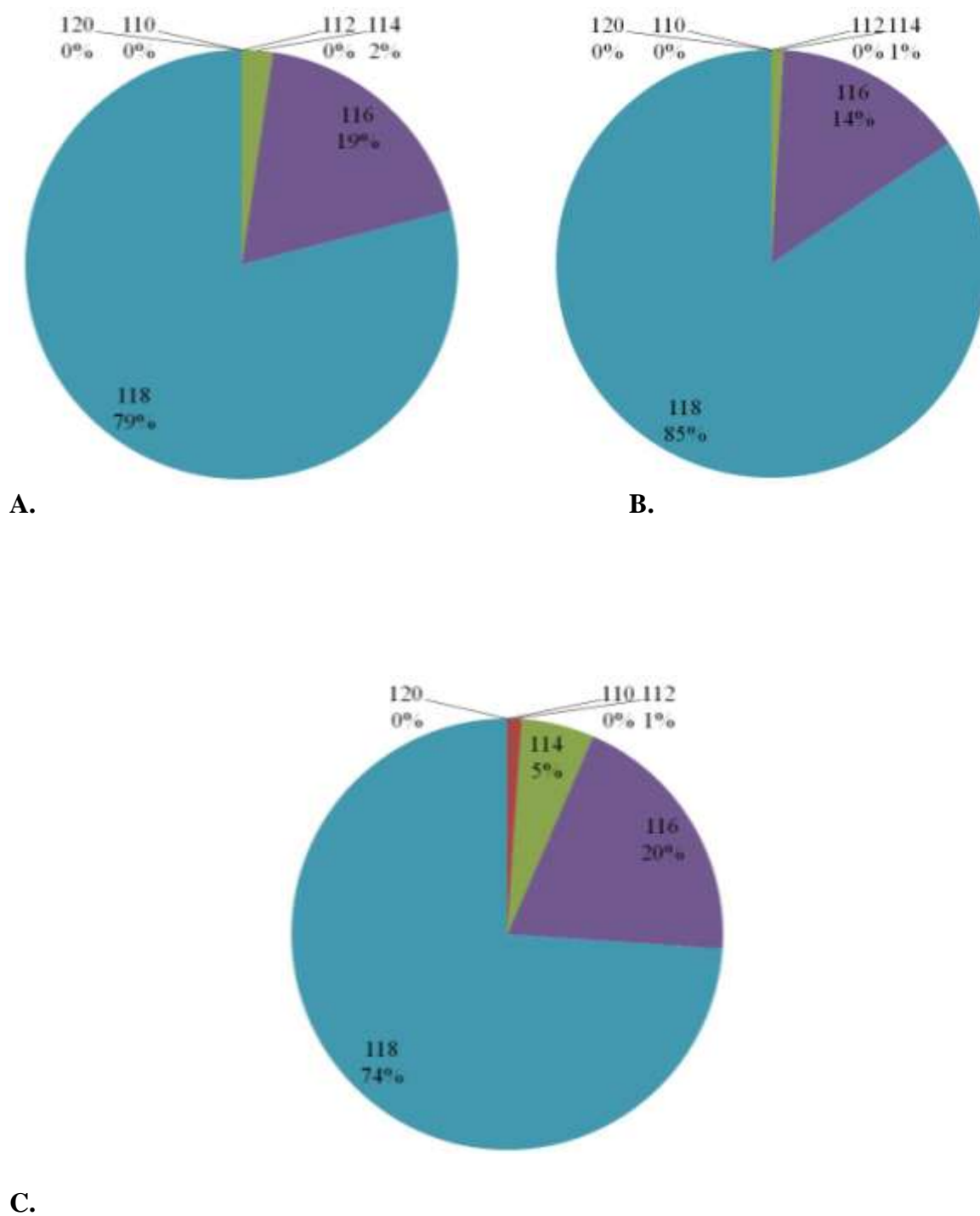


Figura 34. Frecuencia de Alelos obtenidos en el microsatélite L47 polimórfico de *R. ecuadoriensis* en los hábitats A. Domicilio. B. Peridomicilio y C. Silvestre de la provincia de Loja.

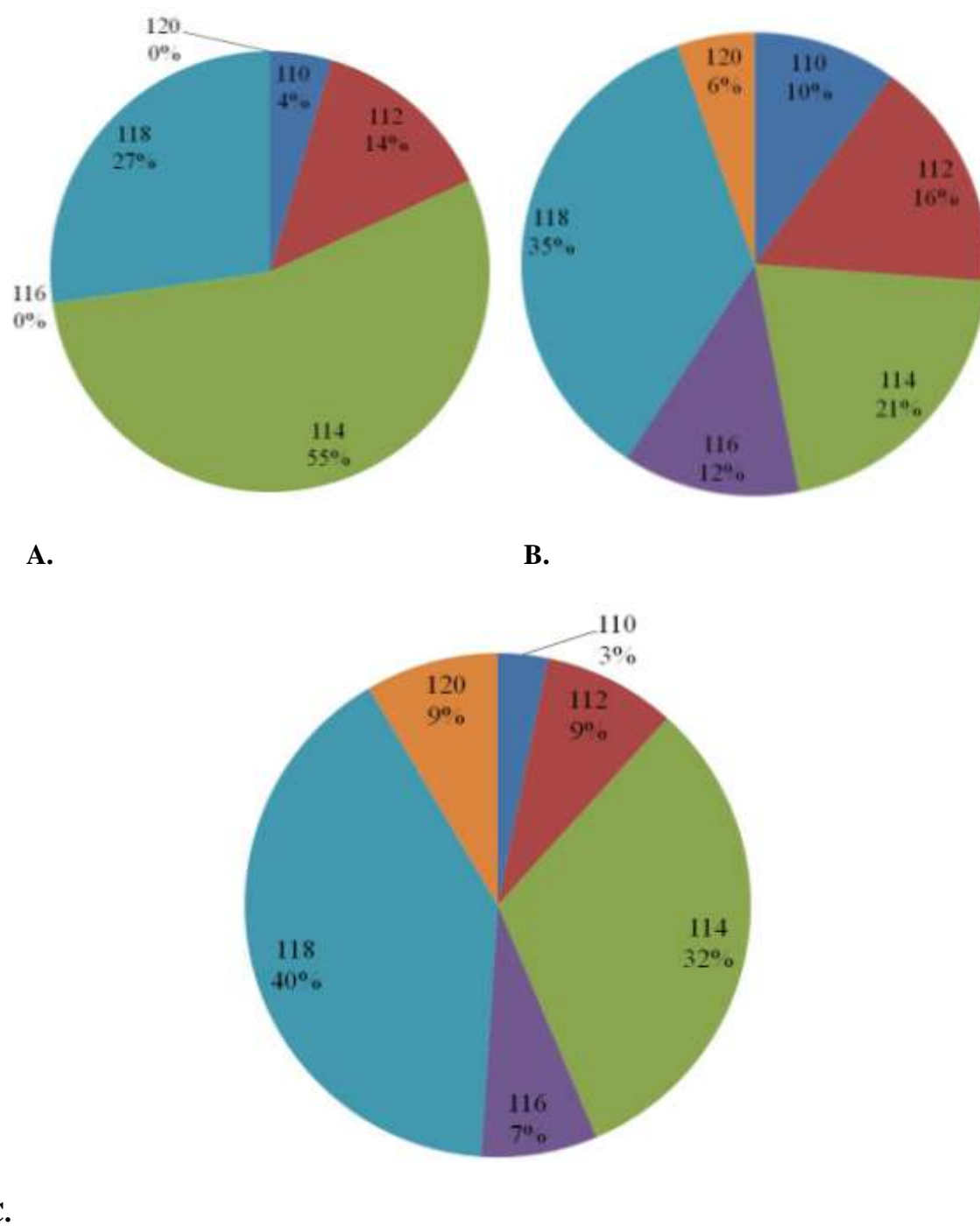


Figura 35. Frecuencia de Alelos obtenidos en el microsatélite L47 polimórfico de *R. ecuadoriensis* en los hábitats **A.** Domicilio **B.** Peridomicilio y **C.** Silvestre de la provincia de Manabí

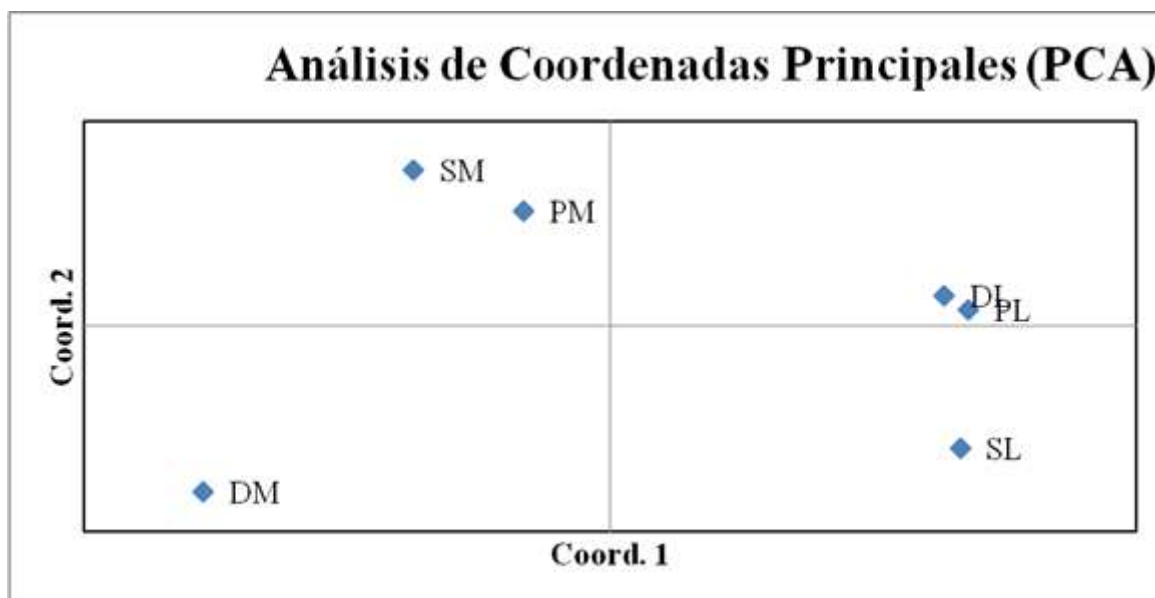


Figura 36. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de los dos microsatélites polimórficos (L13 y L47) en los tres diferentes hábitats de las provincias de Loja (L) y Manabí (M): domicilio (DL, DM), peridomicilio (PL; PM) y silvestre (SL, SM). No hay diferencias significativas entre las subpoblaciones, demostrando flujo entre ellas.

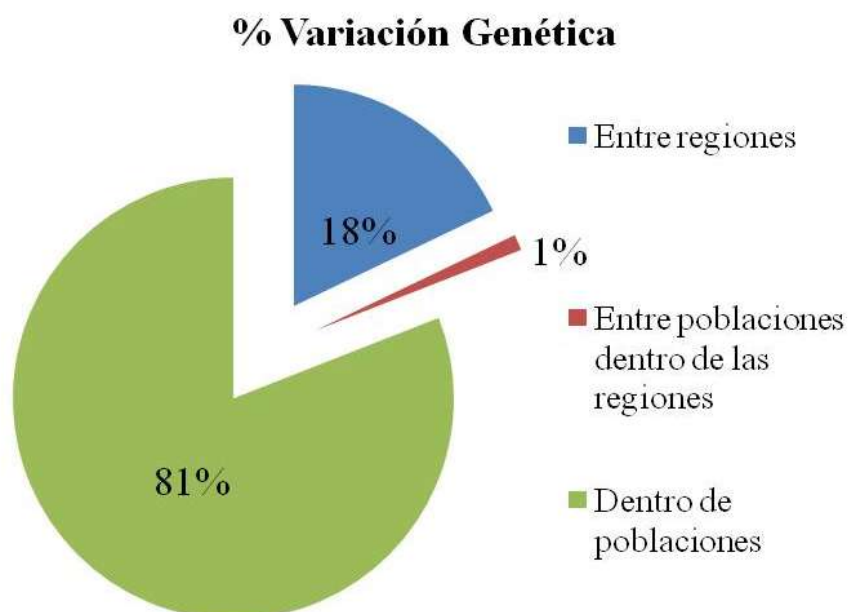


Figura 37. Análisis Jerárquico de Varianza Molecular (AMOVA) de la variación genética de *R. ecuadoriensis*. El AMOVA, se obtuvo de dos microsatélites polimórficos (L13, L47) en los tres hábitats de las provincias de Loja (L) y Manabí (M): domicilio (DL, DM), peridomicilio (PL; PM) y silvestre (SL, SM).

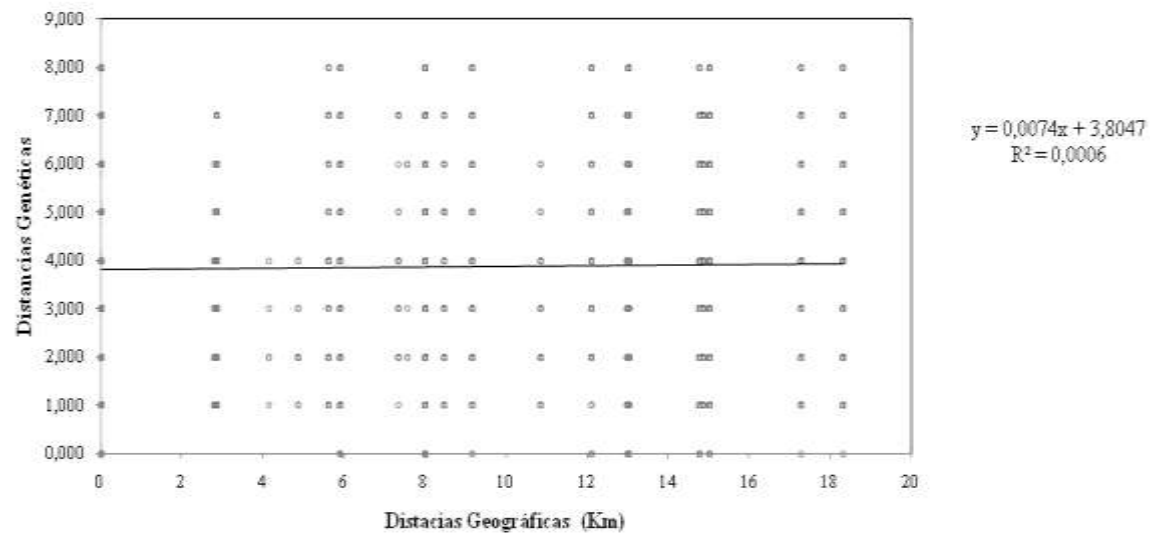
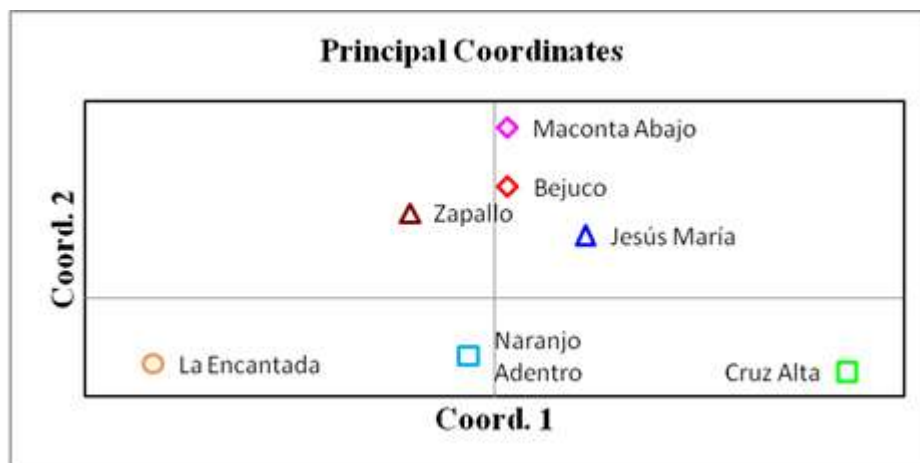
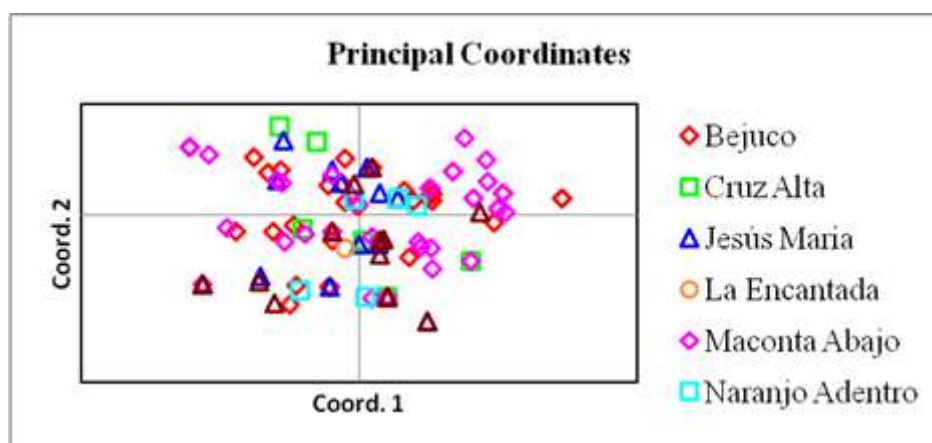


Figura 38. Estructura espacial y genética de *R. ecuadoriensis* en la provincia de Manabí. Correlación de la matriz de distancias genéticas (D_{AS}) y geográficas (km). No se observa una correlación significativa entre las dos matrices analizadas a pesar de poseer un valor de p altamente significativo ($R_{xy} = 0.025$, $p < 0.001^{***}$).



A.



B.

Figura 39 Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) utilizando dos microsatélites polimórficos (L13 y L47) en las comunidades de la provincia de Manabí. No hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los individuos, demostrando flujo entre ellas. A. poblaciones. B. Individuos

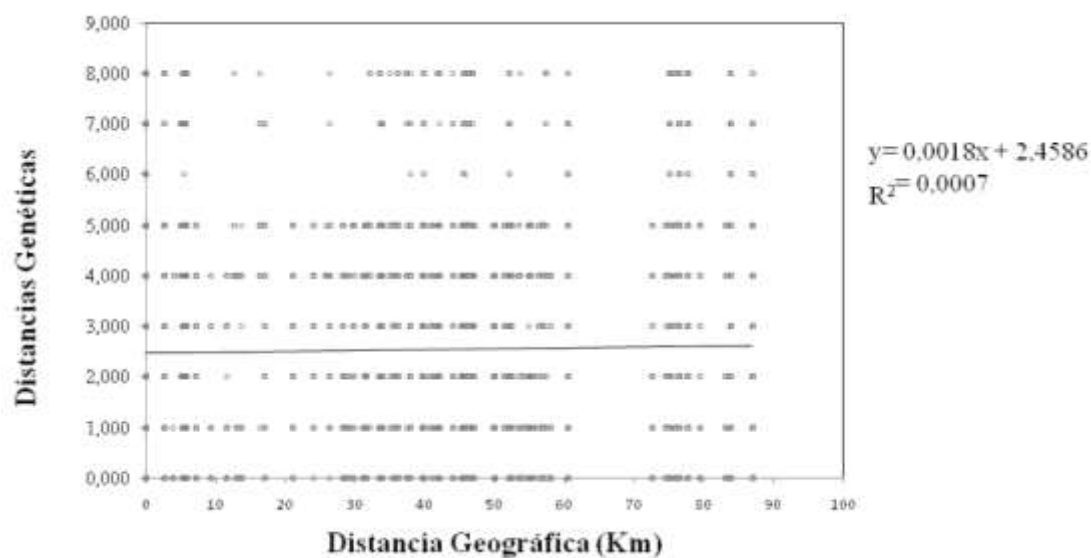
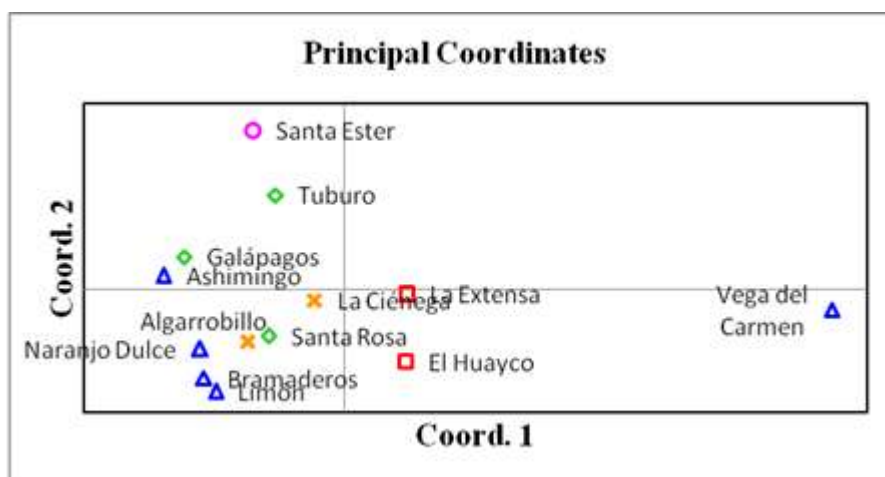
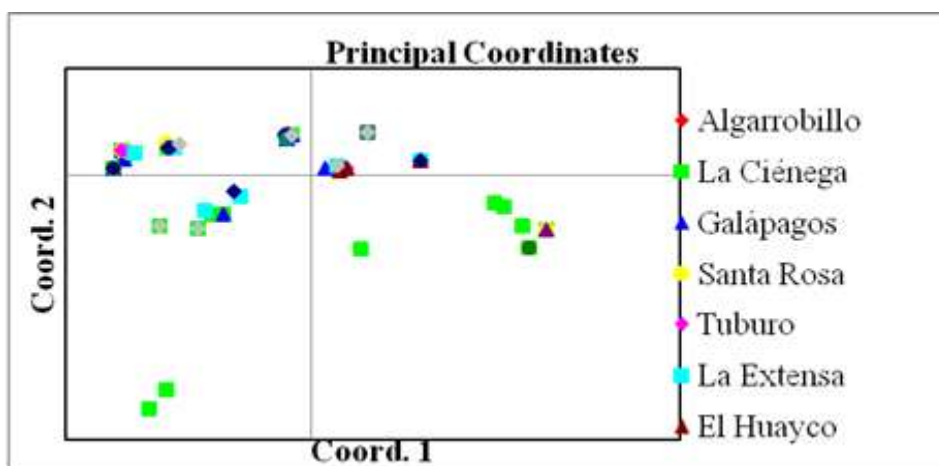


Figura 40. Estructura espacial y genética de *R. ecuadoriensis* en la provincia de Loja.

Correlación de la matriz de distancias genéticas (D_{AS}) y geográficas (km). Se evidenció una fuerte estructura espacial relacionada con la distancia ($R_{xy} = 0.175$, $p < 0.000$), comprobando aislamiento entre las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Loja; sin embargo, hay que aumentar el número de microsatélites para mejorar la resolución.



A.



B.

Figura 41. Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) utilizando dos microsateélites polimórficos (L13 y L47) en la provincia de Loja. Se observa agrupamiento. A. Poblaciones B. Individuos.

9.TABLAS

Tabla 1. Localización Geográfica de las poblaciones analizadas de *Rhodnius ecuadoriensis*

| Especie | Región | Provincia | Cantón | Comunidad | Altitud (msnm) | Latitud (S) | Longitud (O) |
|-----------------------------------|-------------------------|------------------|---------------|------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> | Región Central Costa | Manabí | Portoviejo | Zapallo | 52 | -1,01332 | -80,21398 |
| | | | | Maconta Abajo | 68-144 | -1,081 | -80,413 |
| | | | | Jesús María | 65-400 | -1,020 | -80,228 |
| | | | | Bejuco | 65-400 | -0,9495 | -80,331 |
| | | | | Cruz Alta | 105-150 | -0,9950 | -80,2776 |
| | | | | La Encantada | 290 | -0,9922 | -80,3519 |
| | | | | Naranjo Adentro | 65-400 | -0,963 | -80,2282 |
| | Región Sur Andina | Loja | Celica | La Ciénega | 580-870 | -4,1960 | -80,104 |
| | | | | Algarroillo | 600 | -4,1723 | -80,0643 |
| | | | Quilanga | Galápagos | 1200-1400 | -4,356 | -79,730 |
| | | | | Santa Rosa | 730 to 850 | -4,160 | -80,080 |
| | | | | Tuburo | 182 | -4,3834 | -80,3492 |
| | | | Catamayo | La Extensa | 1207-1295 | -4,032 | -79,3705 |
| | | | | El Huayco | 1212 - 1460 | -4,0910 | -79,3228 |
| | | | Paltas | Naranjo Dulce | 1007-1532 | -4,059 | -79,694 |
| | | | | Ashimingo | 870-1150 | -4,030 | -79,730 |
| | | | | Limón | 1121 | -4,04972 | -79,811 |
| | | | | Vega del Carmen | 1121-1683 | -4,127 | -79,604 |
| | | | Gonzanamá | Bramaderos | 916 | -4,0793 | -79,8223 |
| | | | | Santa Ester | 1083 | -4,1238 | -79,5581 |

Tabla 2. Diez y seis cruces entre especímenes de *R. ecuadoriensis* recolectados en Loja y Manabí. () El número de especímenes por sexo.

| Cruce | | | | Origen del Cruce | | | |
|--------------|------------------|------------------|-------------|-------------------------|------------------|------------------|-------------|
| | Provincia | Comunidad | Sexo | Cruce | Provincia | Comunidad | Sexo |
| 1 | Loja | Coamine | H (1) | X | Manabí | Naranjo Adentro | M (2) |
| 2 | Loja | Limón | M (2) | X | Manabí | Bejuco | H (1) |
| 3 | Loja | Limón | M (2) | X | Manabí | Naranjo Adentro | H (1) |
| 4 | Loja | Limón | H (1) | X | Manabí | Zapallo | M (2) |
| 5 | Loja | Higinda | M (2) | X | Manabí | Naranjo Adentro | H (1) |
| 6 | Loja | Coamine | H (1) | X | Manabí | Bejuco | M (2) |
| 7 | Loja | Coamine | M (2) | X | Manabí | Naranjo Adentro | H (1) |
| 8 | Loja | Coamine | H (1) | X | Manabí | Bejuco | M (2) |
| 9 | Loja | Coamine | H (1) | X | Manabí | Bejuco | M (2) |
| 10 | Loja | Coamine | M (2) | X | Manabí | Naranjo Adentro | H (1) |
| 11 | Loja | Coamine | M (2) | X | Manabí | Bejuco | H (1) |
| 12 | Loja | Coamine | H (1) | X | Manabí | Naranjo Adentro | M (2) |
| 13 | Loja | Bramaderos | M (2) | X | Manabí | Naranjo Adentro | H (1) |
| 14 | Loja | Bramaderos | M (2) | X | Manabí | Bejuco | H (1) |
| 15 | Loja | Coamine | M (2) | X | Manabí | Bejuco | H (1) |
| 16 | Loja | Bramaderos | H (1) | X | Manabí | Zapallo | M (2) |
| TOTAL | | | 25 | | | | 23 |

Tabla 3. Información de los Loci de *Rhodnius pallescens* para la evaluación de polimorfismo y análisis de microsatélites en *R. ecuadoriensis*.

| Locus | Secuencias de los Primer (5' -3') | Orden del Rearreglo | Flourocromo | T _a (°C) | Tamaño del producto de PCR (bp) en <i>R. pallescens</i> | Número de alelos en <i>R. pallescens</i> |
|-------|--|---|-------------|---------------------|---|--|
| L3 | F: AAGGGAGAAAGGCCTGAG R: TCGTGACATCCTTTGTGTAAG F: GGATGAAAAACCCAAGGA | (CA) ₈ N ₁₀ (CA) ₂ | FAM | 57 | 88-113 | 11 |
| L9 | R: GCATTCAACTAATATCTCTTTAATTT F: CCGGTCAGGGAAACATCA | (TA) ₄ T(GT) ₉ | HEX | 55 | 277-297 | 8 |
| L13 | R: GCCCTTGAAACTTACTTATCAGTT F: CGTGCGGTGCAACTACTC | (GT) ₉ | HEX | 60 | 166-175 | 6 |
| L25 | R: GGAGTTATTAATGAAAGTTTCGTG F: ACAGGTTGTACAGCGCGTC | A ₁₀ (GA) ₆ | FAM | 58 | 161-166 | 5 |
| L43 | R: CATGTTCCGTCACGTAGGC F: TGATTGAGAAAGTGTATGTTCGT | (GT) ₃ N ₈ (CT) ₂ (GT) ₁₃ | HEX | 56 | 114-135 | 8 |
| L47 | R: TGTGCAAGTCAGCACGTC | (GT) ₅ N ₂ (GT) ₂ N ₂ (GT) ₇ N ₂ (GT) ₄ | HEX | 59 | 120-124 | 2 |

Tabla 4. Índices entomológicos por Triatominos (*Rhodnius ecuadoriensis*, *Triatoma carrioni*, *Panstrongylus chinai* y *P. rufotuberculatus*) obtenidos en los hábitats sinantrópicos (domicilio+ peridomicilio) en 13 comunidades de la Provincia de Loja.

| # | Comunidad | Cantón | N de viviendas examinadas | N de viviendas infestadas | N de viviendas con ninfas | N de Triatominos colectados | Índice de Infestación (%) | Índice de Densidad | Índice de Hacinamiento | Índice de Colonización (%) |
|--------------|-----------------|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|------------------------|----------------------------|
| 1 | Naranjo Dulce | Paltas | 36 | 7 | 6 | 49 | 19,4 | 1,4 | 7 | 85,7 |
| 2 | Vega del Carmén | Paltas | 39 | 3 | 2 | 124 | 7,7 | 3,2 | 41,3 | 66,7 |
| 3 | Limón | Paltas | 43 | 6 | 3 | 20 | 14,0 | 0,5 | 3,3 | 50 |
| 4 | Ashimingo | Paltas | 29 | 7 | 6 | 252 | 24,1 | 8,7 | 36 | 85,7 |
| 5 | Bramaderos | Paltas | 60 | 13 | 12 | 771 | 21,7 | 12,9 | 59,3 | 92,3 |
| 6 | Tuburo | Quilanga | 27 | 5 | 5 | 905 | 18,5 | 33,5 | 181 | 100 |
| 7 | Galápagos | Quilanga | 34 | 10 | 8 | 733 | 29,4 | 21,6 | 73,3 | 80 |
| 8 | Santa Rosa | Quilanga | 39 | 8 | 7 | 220 | 20,5 | 5,6 | 27,5 | 87,5 |
| 9 | La Extensa | Catamayo | 47 | 5 | 3 | 397 | 10,6 | 8,4 | 79,4 | 60 |
| 10 | El Huayco | Catamayo | 34 | 3 | 2 | 233 | 8,8 | 6,9 | 77,7 | 66,7 |
| 11 | Algarrobbillo | Celica | 48 | 9 | 7 | 362 | 18,8 | 7,5 | 40,2 | 77,8 |
| 12 | La Ciénega | Celica | 42 | 11 | 7 | 531 | 26,2 | 12,6 | 48,3 | 63,6 |
| 13 | Santa Ester | Gonzanamá | 27 | 8 | 7 | 45 | 29,6 | 1,7 | 5,6 | 87,5 |
| TOTAL | | | 505 | 95 | 75 | 4642 | 18,8 | 9,2 | 48,9 | 78,9 |

Tabla 5. Índices entomológicos de *R. ecuadoriensis* obtenidos en el hábitat domiciliar en 13 comunidades de la Provincia de Loja.

| Domiciliar | | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| N | Comunidad | Cantón | N de viviendas examinadas | N de viviendas infestadas | N de viviendas con ninfas | N de Triatominos colectados | Índice de Infestación (%) | Índice de Densidad | Índice de Hacinamiento | Índice de Colonización (%) |
| 1 | Naranjo Dulce | Paltas | 36 | 1 | 1 | 1 | 2,8 | 0 | 1 | 100 |
| 2 | Vega del Carmén | Paltas | 39 | 1 | 1 | 35 | 2,6 | 0,9 | 35 | 100 |
| 3 | Limón | Paltas | 43 | 4 | 2 | 17 | 9,3 | 0,4 | 4,25 | 50 |
| 4 | Ashimingo | Paltas | 29 | 4 | 3 | 17 | 13,8 | 0,6 | 4,25 | 75 |
| 5 | Bramaderos | Paltas | 60 | 3 | 2 | 10 | 5,0 | 0,2 | 3,3 | 66,7 |
| 6 | Tuburo | Quilanga | 27 | 3 | 3 | 55 | 11,1 | 2,0 | 18,3 | 100 |
| 7 | Galápagos | Quilanga | 34 | 7 | 6 | 39 | 20,6 | 1,1 | 5,6 | 85,7 |
| 8 | Santa Rosa | Quilanga | 39 | 4 | 4 | 43 | 10,3 | 1,1 | 10,75 | 100 |
| 9 | La Extensa | Catamayo | 47 | 1 | 1 | 60 | 2,1 | 1,3 | 60 | 100 |
| 10 | El Huayco | Catamayo | 34 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - |
| 11 | Algarrobillo | Celica | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - |
| 12 | La Ciénega | Celica | 42 | 2 | 2 | 4 | 4,8 | 0,1 | 2 | 100 |
| 13 | Santa Ester | Gonzanamá | 27 | 3 | 2 | 5 | 11,1 | 0,2 | 1,7 | 66,7 |
| TOTAL | | | 505 | 33 | 27 | 286 | 6,5 | 0,6 | 8,7 | 81,8 |

Tabla 6. Índices entomológicos de *R. ecuadoriensis* obtenidos en el hábitat peridomiciliar en 13 comunidades de la Provincia de Loja.

| Peridomicilio | | | | | | | | | | |
|---------------|------------------------|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|------------------------|----------------------------|
| N | Comunidad | Cantón | N de viviendas examinadas | N de viviendas infestadas | N de viviendas con ninfas | N de Triatominos colectados | Índice de Infestación (%) | Índice de Densidad | Índice de Hacinamiento | Índice de Colonización (%) |
| 1 | Naranjo Dulce Vega del | Paltas | 36 | 3 | 3 | 22 | 8,3 | 0,6 | 7,3 | 100 |
| 2 | Carmén | Paltas | 39 | 2 | 2 | 101 | 5,1 | 2,6 | 50,5 | 100 |
| 3 | Limón | Paltas | 43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - |
| 4 | Ashimingo | Paltas | 29 | 2 | 2 | 226 | 6,9 | 7,8 | 113 | 100 |
| 5 | Bramaderos | Paltas | 60 | 11 | 10 | 744 | 18,3 | 12,4 | 67,6 | 90,9 |
| 6 | Tuburo | Quilanga | 27 | 4 | 4 | 850 | 14,8 | 31,5 | 212,5 | 100 |
| 7 | Galápagos | Quilanga | 34 | 6 | 6 | 694 | 17,6 | 20,4 | 115,7 | 100 |
| 8 | Santa Rosa | Quilanga | 39 | 2 | 2 | 16 | 5,1 | 0,4 | 8 | 100 |
| 9 | La Extensa | Catamayo | 47 | 3 | 3 | 327 | 6,4 | 7,0 | 109 | 100 |
| 10 | El Huayco | Catamayo | 34 | 2 | 2 | 231 | 5,9 | 6,8 | 115,5 | 100 |
| 11 | Algarrobillo | Celica | 48 | 7 | 6 | 127 | 14,6 | 2,6 | 18,1 | 85,7 |
| 12 | La Ciénega | Celica | 42 | 7 | 5 | 518 | 16,7 | 12,3 | 74 | 71,4 |
| 13 | Santa Ester | Gonzanamá | 27 | 2 | 2 | 24 | 7,4 | 0,9 | 12 | 100 |
| TOTAL | | | 505 | 51 | 47 | 3880 | 10,1 | 7,7 | 76,1 | 92,2 |

Tabla 7. Índices entomológicos de *R. ecuadoriensis* obtenidos en el hábitat silvestre en 5 comunidades de la Provincia de Loja.

| | Comunidad | Cantón | N de nidos examinados | N de nidos infestados | N de nidos con ninfas | N de Triatominos colectados | Índice de Infestación (%) | Índice de Densidad | Índice de Hacinamiento | Índice de Colonización (%) |
|--------------|------------------|----------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------------|
| 1 | Naranjo Dulce | Paltas | 20 | 4 | 4 | 40 | 20,0 | 2,0 | 10 | 100 |
| 2 | Tuburo | Quilanga | 9 | 1 | 1 | 9 | 11,1 | 1,0 | 9,0 | 100 |
| 3 | Galápagos | Quilanga | 117 | 14 | 12 | 150 | 12,0 | 1,3 | 10,7 | 85,7 |
| 4 | Santa Rosa | Quilanga | 36 | 2 | 2 | 22 | 5,6 | 0,6 | 11,0 | 100 |
| 5 | La Ciénega | Celica | 32 | 7 | 4 | 63 | 21,9 | 2,0 | 9,0 | 57,1 |
| TOTAL | | | 214 | 28 | 23 | 284 | 13,1 | 1,3 | 10,1 | 82,1 |

Tabla 8. Índices entomológicos por Triatominos (*R. ecuadoriensis*, *Panstrongylus chinai* y *P. rufotuiberculatus*) obtenidos en los hábitats sinantrópicos (domicilio+ peridomicilio) en 8 comunidades del Cantón Portoviejo, Provincia de Manabí.

| N | Comunidad | N de viviendas examinadas | N de viviendas infestadas | N de viviendas con ninfas | N de Triatominos colectados | Índice de Infestación (%) | Índice de Densidad | Índice de Hacinamiento | Índice de Colonización (%) |
|--------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|------------------------|----------------------------|
| 1 | Maconta Abajo | 29 | 8 | 6 | 170 | 27,6 | 5,9 | 21,2 | 75 |
| 2 | Quebrada de Maconta | 125 | 30 | 27 | 2384 | 24,0 | 19,1 | 79,5 | 90 |
| 3 | Zapallo | 1 | 1 | 1 | 70 | 100 | 70 | 70 | 100 |
| 4 | Bejuco | 58 | 8 | 7 | 45 | 13,8 | 0,8 | 5,6 | 87,5 |
| 5 | Cruz Alta | 114 | 15 | 10 | 95 | 13,2 | 0,8 | 6,3 | 66,7 |
| 6 | La Encantada | 123 | 37 | 15 | 374 | 30,1 | 3,0 | 10,1 | 40,5 |
| 7 | Jesús María | 30 | 5 | 4 | 49 | 16,7 | 1,6 | 9,8 | 80 |
| 8 | Naranjo Adentro | 1 | 1 | 1 | 25 | 100 | 25 | 25 | 100 |
| TOTAL | | 481 | 105 | 71 | 3212 | 21,8 | 6,7 | 30,6 | 67,6 |

Tabla 9. Índices entomológicos de *R. ecuadoriensis* obtenidos en el hábitat domiciliar en 8 comunidades del Cantón Portoviejo, Provincia de Manabí.

| | | Domiciliar | | | | | | | |
|-------|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|------------------------|----------------------------|
| N | Comunidad | N de viviendas examinadas | N de viviendas infestadas | N de viviendas con ninfas | N de Triatominos colectados | Indice de Infestación (%) | Indice de Densidad | Indice de Hacinamiento | Indice de Colonización (%) |
| 1 | Maconta Abajo | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - |
| 2 | Quebrada de Maconta | 125 | 4 | 1 | 15 | 3,2 | 0,1 | 3,8 | 25 |
| 3 | Zapallo | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - |
| 4 | Bejuco | 58 | 1 | 0 | 1 | 1,7 | 0,02 | 1 | 0 |
| 5 | Cruz Alta | 114 | 6 | 0 | 39 | 5,3 | 0,3 | 6,5 | 0 |
| 6 | La Encantada | 123 | 11 | 0 | 22 | 8,9 | 0,2 | 2 | 0 |
| 7 | Jesús María | 30 | 1 | 0 | 1 | 3,3 | 0 | 1 | 0 |
| 8 | Naranjo Adentro | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - |
| TOTAL | | 481 | 23 | 1 | 78 | 4,8 | 0,2 | 3,4 | 4,3 |

Tabla 10. Índices entomológicos de *R. ecuadoriensis* obtenidos en el hábitat peridomiciliar en 8 comunidades del Cantón Portoviejo, Provincia de Manabí.

| | | Peridomicilio | | | | | | | |
|--------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|------------------------|----------------------------|
| N | Comunidad | N de viviendas examinadas | N de viviendas infestadas | N de viviendas con ninfas | N de Triatominos colectados | Índice de Infestación (%) | Índice de Densidad | Índice de Hacinamiento | Índice de Colonización (%) |
| 1 | Maconta Abajo | 29 | 7 | 6 | 168 | 24,1 | 5,8 | 24 | 85,7 |
| 2 | Quebrada de Maconta | 125 | 27 | 25 | 2315 | 21,6 | 18,5 | 85,7 | 92,6 |
| 3 | Zapallo | 1 | 1 | 1 | 70 | 100 | 70 | 70 | 100 |
| 4 | Bejuco | 58 | 5 | 4 | 30 | 8,6 | 0,5 | 6 | 80 |
| 5 | Cruz Alta | 114 | 7 | 6 | 52 | 6,1 | 0,5 | 7,4 | 85,7 |
| 6 | La Encantada | 123 | 13 | 10 | 281 | 10,6 | 2,3 | 21,6 | 76,9 |
| 7 | Jesús María | 30 | 5 | 4 | 41 | 16,7 | 1,4 | 8,2 | 80 |
| 8 | Naranjo Adentro | 1 | 1 | 1 | 25 | 100 | 25 | 25 | 100 |
| TOTAL | | 481 | 66 | 57 | 2982 | 13,7 | 6,2 | 45,2 | 86,4 |

Tabla 11. Índices entomológicos por Triatominos (*R. ecuadoriensis* y *P. howardi*) obtenidos en el hábitat silvestre en 2 comunidades de la Provincia de Manabí.

| | Comunidad | Cantón | N de nidos examinados | N de nidos infestados | N de nidos con ninfas | N de Triatominos colectados | Indice de Infestación (%) | Indice de Densidad | Indice de Hacinamiento | Indice de Colonización (%) |
|-------|---------------|------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------------|
| 1 | Maconta Abajo | Portoviejo | 59 | 18 | 16 | 96 | 30,5 | 1,6 | 5,3 | 88,9 |
| 2 | Bejuco | | 193 | 38 | 33 | 249 | 19,7 | 1,3 | 6,6 | 86,8 |
| TOTAL | | | 252 | 56 | 49 | 345 | 22,2 | 1,4 | 6,2 | 87,5 |

Tabla 12. Promedios y Desviación estándar () del número de sensilla antenales de *R. ecuadoriensis* separado por sexo y por hábitat en la provincia de Loja.

| Sexo | Hábitat | Pedicelo | | Flagelo 1 | | | Flagelo 2 | | | |
|-------------------------------|----------------------|----------|--------|-----------|--------|---------|-----------|--------|--------|-------|
| | | BR* | BR | TPF* | TPG* | BA | BR | TPF | TPG* | BA |
| Hembras N 28 | Silvestre | 59,0 | 21,7 | 36,2 | 63,0 | 15,1 | 12,3 | 39,2 | 73,6 | 20,1 |
| | | (7,2) | (2,6) | (10,6) | (19,2) | (5,4) | (3,1) | (12,1) | (15,9) | (6,4) |
| | Peridomicilio | 56,6 | 22,0 | 42,2 | 72,7 | 18,6 | 13,9 | 45,5 | 90,4 | 24,7 |
| | | (5,8) | (3,8) | (8,6) | (10,2) | (4,5) | (3,0) | (11,7) | (11,9) | (6,0) |
| | Domicilio | 54,8 | 22,2 | 25,2 | 41,2 | 11,8 | 12,3 | 30,8 | 60,3 | 18,0 |
| | | (6,9) | (4,7) | (7,3) | (6,7) | (5,0) | (1,9) | (8,7) | (9,5) | (6,9) |
| Machos N 31 | Silvestre | 53,50 | 24,70 | 39,70 | 57,90 | 15,90 | 12,90 | 41,10 | 75,40 | 20,70 |
| | | (4,7) | (12,0) | (18,3) | (19,7) | (7,4) | (7,8) | (12,9) | (13,0) | (6,3) |
| | Peridomicilio | 59,45 | 21,36 | 44,00 | 73,09 | 17,64 | 13,36 | 43,73 | 90,73 | 27,82 |
| | | (3,8) | (5,4) | (7,8) | (15,2) | (4,5) | (2,5) | (6,4) | (8,9) | (4,3) |
| | Domicilio | 61,90 | 25,50 | 36,50 | 68,30 | 16,90 | 14,90 | 39,30 | 88,20 | 23,20 |
| | | (7,4) | (4,6) | (13,8) | (19,8) | (8,9,0) | (3,9) | (6,1) | (12,3) | (9,0) |

* Sensilla antenales que presentaron diferencias significativas.

Tabla 13. Promedios y Desviación estándar () del número de sensilla antenales de *R. ecuadoriensis* separado por sexo y por hábitat en la provincia de Manabí.

| Sexo | Hábitat | Pedicelo | | Flagelo 1 | | Flagelo 2 | | | | |
|----------------|----------------------|-----------------|-----------|------------------|-------------|------------------|-----------|------------|-------------|-----------|
| | | BR* | BR | TPF* | TPG* | BA | BR | TPF | TPG* | BA |
| Hembras | Silvestre | 80,0 | 25,4 | 55,7 | 109,9 | 22,0 | 13,4 | 42,9 | 111,9 | 27,0 |
| | | (11,2) | (5,3) | (14,5) | (43,0) | (9,9) | (2,1) | (6,9) | (38,1) | (6,4) |
| | Peridomicilio | 79,2 | 23,6 | 53,3 | 98,4 | 19,5 | 12,3 | 44,1 | 103,1 | 25,1 |
| | | (8,8) | (6,3) | (22,4) | (35,7) | (8,8) | (2,5) | (9,2) | (26,7) | (6,0) |
| Machos | Silvestre | 81,2 | 26,5 | 61,0 | 111,8 | 26,1 | 14,1 | 50,9 | 116,8 | 27,1 |
| | | (25,2) | (1,6) | (11,6) | (25,4) | (7,2) | (2,9) | (7,9) | (24,7) | (9,1) |
| | Peridomicilio | 80,0 | 27,6 | 66,2 | 112,2 | 20,9 | 15,7 | 52,9 | 132,6 | 30,6 |
| | | (26,0) | (6,3) | (16,0) | (33,5) | (9,5) | (0,7) | (8,8) | (29,5) | (5,4) |

* Sensilla antenales que presentaron diferencias significativas.

Tabla 14. Promedios y Desviación estándar () del número de sensilla antenales de *Rhodnius ecuadoriensis* separado por sexo y por provincia (Loja y Manabí).

| Loja | | | | | | | | | |
|----------------|-----------------|-----------|------------------|-------------|-----------|------------------|------------|-------------|-----------|
| | Pedicelo | | Flagelo 1 | | | Flagelo 2 | | | |
| Sexo | BR* | BR | TPF* | TPG* | BA | BR | TPF | TPG* | BA |
| Hembras | 57,2 | 21,9 | 35,9 | 61,8 | 15,6 | 12,9 | 39,6 | 76,7 | 21,3 |
| N 28 | (6,6) | (3,4) | (11,0) | (18,2) | (5,5) | (2,9) | (12,2) | (17,3) | (6,8) |
| Machos | 58,3 | 23,8 | 40,2 | 66,6 | 16,8 | 13,7 | 41,5 | 85,0 | 24,0 |
| N 31 | (6,4) | (7,9) | (13,7) | (18,7) | (6,9) | (5,1) | (8,9) | (13,0) | (7,2) |

| Manabí | | | | | | | | | |
|----------------|-----------------|-----------|------------------|-------------|-----------|------------------|------------|-------------|-----------|
| | Pedicelo | | Flagelo 1 | | | Flagelo 2 | | | |
| Sexo | BR* | BR | TPF* | TPG* | BA | BR | TPF | TPG* | BA |
| Hembras | 79,6 | 24,5 | 54,4 | 103,9 | 20,8 | 12,8 | 43,5 | 107,3 | 26,0 |
| N 20 | (9,7) | (5,8) | (18,7) | (38,8) | (9,2) | (2,4) | (8,0) | (32,1) | (6,1) |
| Machos | 80,6 | 27,0 | 63,6 | 112,0 | 23,5 | 14,9 | 51,9 | 124,7 | 28,8 |
| N 20 | (8,2) | (4,5) | (13,9) | (29,1) | (8,7) | (2,2) | (8,2) | (27,7) | (7,5) |

* Sensilla antenales que presentaron diferencias significativas.

Tabla 15. Promedios y Desviación estándar del número de sensilla antenales de *Rhodnius ecuadoriensis* (n= 99) de Loja y Manabí. *R. colombiensis* (n= 6) y *R. pallescens* (n= 5).

| ESPECIE | SEXO | Pedicelo | | Flagelo 1 | | | Flagelo 2 | | | |
|-------------------------|----------------|----------|-------|-----------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|
| | | BR * | BR* | TPF* | TPG* | BA * | BR | TPF* | TPG* | BA* |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | Machos | 63,6 | 23,9 | 44,6 | 76,4 | 18,1 | 13,7 | 43,4 | 92,1 | 24,3 |
| | N 51 | (12,1) | (6,1) | (17,0) | (29,9) | (7,56) | (3,8) | (11,1) | (27,1) | (7,6) |
| | Hembras | 67,5 | 23,8 | 48,0 | 83,7 | 18,8 | 13,4 | 44,0 | 95,8 | 24,8 |
| | N 48 | (13,8) | (6,1) | (17,8) | (34,8) | (7,9) | (3,5) | (10,8) | (30,0) | (7,2) |
| <i>R. colombiensis</i> | Hembras | 101,0 | 37,3 | 100,5 | 192,5 | 41,6 | 14,1 | 70,2 | 152,0 | 35,2 |
| | N 6 | (13,2) | (3,4) | (19,7) | (19,2) | (10,8) | (2,6) | (12,9) | (23,1) | (4,7) |
| <i>R. pallescens</i> | Hembras | 101,2 | 33,6 | 83,2 | 168,2 | 41,0 | 16,6 | 65,4 | 178,4 | 49,2 |
| | N5 | (4,9) | (3,8) | (11,9) | (20,8) | (5,7) | (1,8) | (10,2) | (13,5) | (10,5) |

* Sensilla antenales que presentaron diferencias significativas.

Tabla 16. Disparidad Métrica (DM) de la conformación alar de *Rhodnius ecuadoriensis* entre los hábitats y entre género (macho y hembra).

| Provincia | Hábitat | Males (n) | Females (n) |
|--------------|--------------|--------------------------|--------------------------|
| Manabí | Peridomestic | 0.00146 (29) | 0.00135 (30) |
| | Sylvatic | 0.00109* (14) | 0.00135 (21) |
| Total | | 0.00128 (43) | 0.00135 (51) |
| Loja | Domestic | 0.00162 (23) | 0.00199* (18) |
| | Peridomestic | 0.00159 (24) | 0.00157 (23) |
| | Sylvatic | 0.00145 (26) | 0.00151 (22) |
| | Total | 0.001553 (73) | 0.00169 (63) |
| Total | | 0.00283 (116) | 0.00304 (114) |

* Sensilla antenales que presentaron diferencias significativas.

Tabla 17. Resumen de la comparación entre las variables fenotípicas de *Rhodnius ecuadoriensis* a nivel geográfico, hábitats [sinantrópicos (domicilio+ peridomicilio) y silvestre] y entre sexo (macho y hembra).

| | Género | Hábitats ^a | Alas | | |
|------------------------------|---------|-----------------------|--------------|--------|------------------|
| | | | Conformación | Tamaño | Fenotipo Antenal |
| Comparación entre | machos | todos | *** | *** | *** |
| Provincias (Loja vs. Manabí) | hembras | todos | *** | *** | *** |
| Entre hábitats | machos | S vs. P | ---- | ---- | ---- |
| MANABI | hembras | S vs. P | ---- | * | ---- |
| Entre hábitats LOJA | machos | S vs. P | *** | ---- | ---- |
| | | S vs. D | *** | ---- | ---- |
| | | D vs. P | ---- | ---- | ---- |
| | hembras | S vs. P | *** | ---- | ---- |
| | | S vs. D | *** | ---- | ---- |
| | | D vs. P | ---- | ---- | *** |

Diferencia estadísticamente significativa. *p < 0.05 , **p < 0.05 - 0.01 , ***p < 0.01; ---- no existe diferencia

^a (hábitats): S: Silvestre, P: Peridomicilio, D:Domicilio

Tabla 18. Viabilidad, tamaño de huevos y tiempo de pre-ovoposición obtenidos en los diez y seis entre especímenes de *R. ecuadoriensis* recolectados en Loja y Manabí.

| | Viabilidad de los huevos (%) | | Número de huevos viables | | Tamaño de los huevos (mm) | | Tiempo de pre-ovoposición (días) | |
|---------------------------------|------------------------------|------|--------------------------|-------|---------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------|
| | Manabí | Loja | Manabí | Loja | Manabí | Loja | Manabí | Loja |
| Cruce de una sola región | 79 | 86 | 1.491 | 1.338 | $1,79 \pm 0,25$ | $1,55 \pm 0,27$ | $15,5 \pm 0,05$ | $13,6 \pm 0,08$ |
| Cruce experimental | | 32 | | 243 | $1,76 \pm 0,13$ | $1,71 \pm 0,13$ | $15,5 \pm 1,5$ | $16,5 \pm 0,03$ |

Tabla 19. Resumen de los índices de diversidad genética del segmento del gene mt Cyt b (670 pb) de *Rhodnius ecuadoriensis* colectados en las Provincias de Loja y Manabí.

| Provincias | N de secuencias | S | H | Hd \pm SD | $\pi \pm$ SD | π con JC | Tajima's <i>D</i> | Fu Li <i>D</i> |
|------------|--------------------|----|----|---------------------|-----------------------|--------------|-------------------------|------------------------|
| Loja | 95 | 39 | 18 | 0.87212 \pm 0.015 | 0.02012 \pm 0.00198 | 0.02066 | 1.88900* | 2.0575* |
| Manabí | 73 | 31 | 21 | 0.891 \pm 0.023 | 0.00800 \pm 0.00322 | 0.00807 | - 0.83680 ^{ns} | - 1.8236 ^{ns} |
| Total | 168 | 53 | 34 | 0.9313 \pm 0.007 | 0.01641 \pm 0.00385 | 0.1674 | 0.208802 ^{ns} | 1.3552 ^{ns} |

N, número de secuencias; **S**, número de sitios polimórficos o variables; **H**, número de haplotipos; **Hd**, diversidad haplotípica; π diversidad nucleotídica; **DS**, Desviación Standard (); **JC**, Corrección de Jukes y Cantor; Tajima's *D* (Tajima, 1989); Fu Li (*D*) (Fu y Li, 1993). * $p < 0.05$; **ns** no significativo

Tabla 20. Resumen del Test de Neutralidad obtenido de las poblaciones *Rhodnius ecuadoriensis* colectados en las Provincias de Loja y Manabí.

| Loja | | | | | | | |
|-----------------|----------------------|----------|----------|------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| Habitats | N de muestras | S | H | Hd ± SD | π ± SD | Tajima's D | Fu Li D |
| Domicilio | 25 | 37 | 10 | 0.870 ± 0.041 | 0.02404 ± 0.00299 | 1.85474* | 1.56298* |
| Peridomicilio | 49 | 36 | 7 | 0.82058 ± 0.021 | 0.02172 ± 0.00258 | 2.13433* | 1.88334* |
| Silvestre | 21 | 16 | 11 | 0.9333 ± 0.030 | 0.00842 ± 0.00067 | 0.54302 ^{ns} | 1.20765 ^{ns} |
| Total | 95 | 39 | 18 | 0.87212 ± 0.015 | 0.02012 ± 0.00198 | 1.88900* | 2.0575* |
| Manabí | | | | | | | |
| Habitats | N de muestras | S | H | Hd ± SD | π ± SD | Tajima's D | Fu Li D |
| Domicilio | 8 | 14 | 7 | 0.964 ± 0.07 | 0.0743 ± 0.00167 | - 0.84821 ^{ns} | - 0.71032 ^{ns} |
| Peridomicilio | 37 | 26 | 12 | 0.89640 ± 0.0006 | 0.00914 ± 0.00098 | - 0.49764 ^{ns} | - 0.61705 ^{ns} |
| Silvestre | 28 | 17 | 12 | 0.83069 ± 0.063 | 0.00640 ± 0.00106 | - 0.39144 ^{ns} | 0.18444 ^{ns} |
| Total | 73 | 31 | 21 | 0.891 ± 0.023 | 0.00800 ± 0.00322 | - 0.83680 ^{ns} | - 1.8236 ^{ns} |

N, número de secuencias; **S**, número de sitios polimórficos o variables; **H**, número de haplotipos; **Hd**, diversidad haplotípica; **π** diversidad nucleotídica; **SD**, Desviación Standard (); **JC**, Corrección de Jukes y Cantor; (Tajima, 1989); Fu Li (*D*) (Fu y Li, 1993). * $p < 0.05$; **ns** no significativo

Tabla 21. Haplotipos, Frecuencia y porcentaje (%) de la presencia de haplotipos de *Rhodnius ecuadoriensis* colectados en las Provincias de Loja y Manabí. 18 Haplotipos en Loja, 21 en Manabí y 3 Haplotipos compartidos entre Loja y Manabí.

| Haplotipos | Frecuencia de Haplotipos en las poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> por Provincia | | Porcentaje (%) de presencia de Haplotipos en las poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> por Provincia | |
|------------|--|------------------|---|--------|
| | Loja (N=95) | Manabí (N=73) | Loja | Manabí |
| HEL1 | 18 | 0 | 18,95 | 0 |
| HEL2 | 5 | 0 | 5,26 | 0 |
| HEL3 | 18 | 0 | 18,95 | 0 |
| HEL4 | 1 | 0 | 1,05 | 0 |
| HEL5 | 1 | 0 | 1,05 | 0 |
| HELM6* | 14 | 6 | 14,74 | 8,22 |
| HEL7 | 3 | 0 | 3,16 | 0 |
| HEL8 | 18 | 0 | 18,95 | 0 |
| HELM9* | 2 | 10 | 2,11 | 13,7 |
| HEL10 | 1 | 0 | 1,05 | 0 |
| HEL11 | 2 | 0 | 2,11 | 0 |
| HEL12 | 3 | 0 | 3,16 | 0 |
| HELM13* | 1 | 3 | 1,05 | 4,11 |
| HEL14 | 1 | 0 | 1,05 | 0 |
| HEL15 | 2 | 0 | 2,11 | 0 |
| HEL16 | 1 | 0 | 1,05 | 0 |

Tabla 21. Haplotipos, Frecuencia y porcentaje (%) de la presencia de haplotipos de *Rhodnius ecuadoriensis* colectados en las Provincias de Loja y Manabí. 18 Haplotipos en Loja, 21 en Manabí y 3 Haplotipos compartidos entre Loja y Manabí.

(continuación...)

| Haplotipos | Frecuencia de Haplotipos en las poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> por Provincia | | Porcentaje (%) de presencia de Haplotipos en las poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> por Provincia | |
|-------------------|---|--------------------------|--|---------------|
| | Loja (N=95) | Manabí (N=73) | Loja | Manabí |
| HEL17 | 2 | 0 | 2,11 | 0 |
| HEL18 | 2 | 0 | 2,11 | 0 |
| HEM19 | 0 | 9 | - | 12,33 |
| HEM20 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM21 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM22 | 0 | 19 | - | 26,03 |
| HEM23 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM24 | 0 | 4 | - | 5,48 |
| HEM25 | 0 | 4 | - | 5,48 |
| HEM26 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM27 | 0 | 3 | - | 4,11 |
| HEM28 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM29 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM30 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM31 | 0 | 3 | - | 4,11 |

Tabla 21. Haplotipos, Frecuencia y porcentaje (%) de la presencia de haplotipos de *Rhodnius ecuadoriensis* colectados en las Provincias de Loja y Manabí. 18 Haplotipos en Loja, 21 en Manabí y 3 Haplotipos compartidos entre Loja y Manabí (continuación).

| Haplotipos | Frecuencia de Haplotipos en las poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> por Provincia | | Porcentaje (%) de presencia de Haplotipos en las poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> por Provincia | |
|------------|--|------------------|---|--------|
| | Loja (N=95) | Manabí (N=73) | Loja | Manabí |
| HEM32 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM33 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM34 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM35 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| HEM36 | 0 | 1 | - | 1,37 |
| TOTAL | 95 | 73 | 100 | 100 |

* Haplotipo que comparten las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis* (Loja y Manabí). HEL = Haplotipo/Ecuador/Loja, HEM = Haplotipo/Ecuador/Manabí, HELM = Haplotipo/Ecuador/Loja/Manabí.

Tabla 22. Cálculos de diferenciación genética (G_{ST}) e índice de fijación (F_{ST}) entre poblaciones y subpoblaciones de *R. ecuadoriensis*.

| Población 1 | Población 2 | G_{ST} | F_{ST} | Dxy | Da |
|--------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|------------|-----------|
| Loja | Manabí | 0.05460 | 0.18238 | 0.01720 | 0.00314 |
| Loja | Loja domicilio | 0.00019 | - 0.00828 | 0.02192 | -0.00018 |
| Loja | Loja peridomicilio | -0.00314 | - 0.01141 | 0.02068 | - 0.00024 |
| Loja | Loja silvestre | 0.01234 | 0.09107 | 0.01570 | 0.00143 |
| Manabí | Loja domicilio | 0.00710 | 0.19171 | 0.01985 | 0.00381 |
| Manabí | Loja peridomicilio | 0.00658 | 0.20537 | 0.01870 | 0.00384 |
| Manabí | Loja silvestre | 0.00286 | 0.22014 | 0.01053 | 0.00232 |
| Loja domicilio | Loja peridomicilio | -0.00343 | - 0.0198 | 0.02246 | - 0.00044 |
| Loja domicilio | Loja silvestre | 0.02440 | 0.15511 | 0.01924 | 0.00298 |
| Loja peridomicilio | Loja silvestre | 0.02529 | 0.12316 | 0.01719 | 0.00212 |
| Loja | Manabi domicilio | 0.00706 | 0.17174 | 0.01663 | 0.00286 |
| Loja | Manabí peridomicilio | 0.06691 | 0.18158 | 0.01787 | 0.00325 |
| Loja | Manabí silvestre | 0.03105 | 0.19512 | 0.01647 | 0.00321 |
| Manabí | Manabi domicilio | 0.01672 | -0.04615 | 0.00737 | -0.00034 |
| Manabí | Manabí peridomicilio | -0.00236 | -0.00411 | 0.00853 | -0.00004 |
| Manabí | Manabí silvestre | 0.00281 | -0.00028 | 0.00720 | -0.00000 |
| Loja domicilio | Manabi domicilio | 0.03550 | 0.18890 | 0.01942 | 0.00367 |
| Loja domicilio | Manabí peridomicilio | 0.05501 | 0.18563 | 0.02039 | 0.00379 |
| Loja domicilio | Manabí silvestre | 0.07509 | 0.20831 | 0.01925 | 0.00401 |

Tabla 22. Cálculos de diferenciación genética e índice de fijación entre poblaciones y subpoblaciones de *R. ecuadoriensis* (Continuación)

| Población 1 | Población 2 | G_{ST} | F_{ST} | D_{xy} | Da |
|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| Loja peridomicilio | Manabi domicilio | 0.04064 | 0.19980 | 0.01821 | 0.00364 |
| Loja peridomicilio | Manabí peridomicilio | 0.06775 | 0.20129 | 0.01932 | 0.00389 |
| Loja peridomicilio | Manabí silvestre | 0.08321 | 0.22052 | 0.01803 | 0.00398 |
| Loja silvestre | Manabi domicilio | 0.01988 | 0.17505 | 0.00961 | 0.00168 |
| Loja silvestre | Manabí peridomicilio | 0.03550 | 0.23672 | 0.01150 | 0.00272 |
| Loja silvestre | Manabí silvestre | 0.05390 | 0.22140 | 0.00952 | 0.00211 |
| Manabí domicilio | Manabi domicilio | 0.00984 | -0.00090 | 0.00827 | - 0.00001 |
| Manabí domicilio | Manabí peridomicilio | 0.01393 | 0.07331 | 0.00644 | - 0.00047 |
| Manabí peridomicilio | Manabí silvestre | 0.01974 | 0.04631 | 0.00814 | 0.00038 |

Tabla 23. Microsatélites de *R. pallescens* utilizados en poblaciones de *R. ecuadoriensis* de las dos provincias (Loja y Manabí)

| Locus | Tamaño del producto de PCR (pb) | N de Alelos | N | Categoría |
|--------------|--|------------------------|----------|----------------------|
| L3 | 86-164 | - | 15 | Dificultad para leer |
| L9 | 267 | 1 | 70 | Monomórfico |
| L13 | 160-174 | 8 | 333 | Polimórfico |
| L25 | 173 | 1 | 70 | Monomórfico |
| L43 | 124-176 | - | 15 | Difícil de leer |
| L47 | 110-120 | 6 | 333 | Polimórfico |

Tabla 24. Evaluación de los dos microsatélites polimórficos (L13, L47) amplificados en 333 especímenes de *Rhodnius ecuadoriensis* pertenecientes a Manabí y Loja.

| Población | Locus | N | Na | Ne | Ho | He | F | ChiSq | HWE * | Signif |
|----------------------|-------|-----|----|----|-----|-----|--------|---------|-------|--------|
| Domicilio Loja | L13 | 38 | 5 | 2 | 0,2 | 0,5 | 0,545 | 57,220 | 0,000 | *** |
| | L47 | 43 | 3 | 2 | 0,4 | 0,3 | -0,096 | 0,839 | 0,840 | ns |
| Peridomicilio Loja | L13 | 111 | 7 | 2 | 0,3 | 0,5 | 0,308 | 109,790 | 0,000 | *** |
| | L47 | 110 | 3 | 1 | 0,3 | 0,3 | 0,036 | 110,072 | 0,000 | *** |
| Silvestre Loja | L13 | 47 | 5 | 2 | 0,1 | 0,4 | 0,783 | 111,111 | 0,000 | *** |
| | L47 | 46 | 4 | 2 | 0,3 | 0,4 | 0,262 | 26,456 | 0,000 | *** |
| Domicilio Manabí | L13 | 11 | 7 | 6 | 0,4 | 0,8 | 0,560 | 36,667 | 0,018 | * |
| | L47 | 11 | 4 | 3 | 0,5 | 0,6 | 0,252 | 4,583 | 0,598 | ns |
| Peridomicilio Manabí | L13 | 65 | 7 | 4 | 0,4 | 0,7 | 0,442 | 151,531 | 0,000 | *** |
| | L47 | 65 | 6 | 4 | 0,8 | 0,8 | 0,030 | 42,558 | 0,000 | *** |
| Silvestre Manabí | L13 | 48 | 7 | 4 | 0,5 | 0,8 | 0,347 | 74,296 | 0,000 | *** |
| | L47 | 47 | 6 | 3 | 0,7 | 0,7 | -0,014 | 21,469 | 0,122 | ns |

N: Número de muestras, **Na:** Número de alelos; **Ne:** Número de alelos efectivos; **Ho:** Heterocigocidad observada; **He:** Heterocigocidad esperada; **F:** Frecuencia del alelo más común; **HWE:** Equilibrio Hardy-Weinberg; Significación: ns= no significativo, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Table 25. Distancias genéticas entre las dos poblaciones de *R. ecuadoriensis* en los tres hábitats estimadas por el método de Nei (1978) (Pairwise Population Fst (via Frequency) Values, a partir de frecuencias alélicas para dos Locus (L13 y L47)).

| | DL | PL | SL | DM | PM | SM |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| DL | 0,000 | | | | | |
| PL | 0,003 | 0,000 | | | | |
| SL | 0,005 | 0,008 | 0,000 | | | |
| DM | 0,178 | 0,208 | 0,184 | 0,000 | | |
| PM | 0,070 | 0,091 | 0,075 | 0,046 | 0,000 | |
| SM | 0,096 | 0,120 | 0,107 | 0,028 | 0,011 | 0,000 |

F_{ST} (Índice de Fijación)

LD: Loja Domicilio; LP: Loja Peridomicilio; LS: Loja Silvestre;

MD: Manabí Domicilio; MP: Manabí Peridomicilio; MS: Manabí Silvestre

En negrita los que presentan diferencias significativas: **$p < 0.05$** , **$** p < 0.01$** , **$*** p < 0.001$**

Tabla 26. Análisis de la Variancia Molecular (AMOVA).

| Fuente Variación | gl | Suma de cuadrados | MS | Componentes de la variancia | % Variación |
|--|-----------|------------------------------|-----------|--|------------------------|
| Entre regiones | 1 | 37,686 | 37,686 | 0,116 | 18% |
| Entre poblaciones dentro de las regiones | 4 | 5,020 | 1,255 | 0,007 | 1% |
| Dentro de poblaciones | 660 | 345,709 | 0,524 | 0,524 | 81% |
| Total | 665 | 388,415 | 39,465 | 0,647 | |

10. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado utilizado para el ingreso del grupo de campo a cada una de las viviendas.



C I E I
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS
Escuela de Biología
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



Investigación de Enfermedad de Chagas en Ecuador
Ohio University, Universidad Católica del Ecuador y Ministerio de Salud Pública del Ecuador
Formulario de Consentimiento Informado. Parte 1A. ENTOMOLOGÍA

Nombres _____ **Apellidos** _____

Comunidad _____

Objetivo del Proyecto: La enfermedad de Chagas afecta a mucha gente en Ecuador. Este proyecto de investigación quiere saber si hay esta enfermedad en su comunidad y porqué. Pedimos su ayuda voluntaria. Su participación ayudará a obtener información valiosa que ayudará a diseñar maneras de controlar y prevenir esta enfermedad. Este estudio incluirá a unas 2000 viviendas aproximadamente.

Participación voluntaria: Usted puede elegir libremente participar o no participar en absoluto en este proyecto de investigación. No habrá ningún tipo de penalización si usted no desea participar. Si se niega a participar Ud. no perderá ninguno de los beneficios de atención de salud que existen normalmente para Ud. Para que usted pueda participar en este proyecto, es necesario que usted entienda lo que se necesita de usted. Si usted acepta colaborar voluntariamente con nosotros, debe firmar (o poner su huella digital) en la línea disponible abajo en este formulario.

Usted puede dejar de participar en este proyecto en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación. De igual manera, los investigadores pueden terminar la participación de Ud. en el mismo. Si éste es el caso, usted será notificado. No hay costo para participar en esta investigación. Si usted tiene dudas sobre la investigación o sobre sus derechos en este proyecto de investigación, por favor pregunte al entrevistador o contacte a las personas nombradas abajo.

Encuesta sobre la vivienda y cuestionario de conocimientos: Un entrevistador solicitará que usted responda a varias preguntas relacionadas con su casa, sus hábitos o costumbres, y sobre usted mismo.

Estas preguntas se refieren a varios factores asociados a la enfermedad de Chagas (tiempo estimado 5 minutos).

Encuesta de insectos: Entomólogos experimentados buscarán la presencia de chinchorros, dentro y alrededor de su casa durante un tiempo de 30 minutos. Si se encuentran chinchorros, personal del Ministerio de Salud (SNEM) le pedirán permiso para preparar su casa para que ésta sea fumigada con un insecticida piretroide. Si usted acepta esto, el personal del SNEM le ayudará a sacar de su casa toda la comida, los utensilios de cocina, ropa y colchones. La preparación y fumigación de su vivienda se llevará a cabo por un tiempo aproximado de 60 minutos.

Confidencialidad: Toda la información que usted proporcione será mantenida confidencialmente y utilizada solamente para propósitos de la investigación sin conexión a su nombre. Los resultados generales, serán compartidos con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador y con su comunidad.

Riesgos: los riesgos potenciales asociados a su participación en esta investigación son la pérdida de la confidencialidad de la información, y posibles molestias ocasionadas por el insecticida. El asignar un código a toda su información y desligarlo de cualquier referencia a su identificación personal reducen al mínimo el riesgo de pérdida de confidencialidad. El insecticida aplicado por el Ministerio de Salud es muy seguro y es recomendado por la Organización Mundial de la Salud para control de insectos dentro de las casas. Sin embargo, en algunos casos puede causar picazón de la piel, dermatitis, alergia, congestión pulmonar o dolor de cabeza. Para reducir este riesgo es importante preparar bien las viviendas antes del rociamiento con los insecticidas sacando toda la ropa, implementos de cocina, comida y ropa de cama fuera de la casa y evitar ingresar a la vivienda por un período de 30 minutos. Si se presentan cualquiera de estas molestias, se recomienda lavar el área afectada con agua y jabón, salir de la vivienda a un lugar ventilado hasta que los síntomas desaparezcan. De no desaparecer, se recomienda que se consulte a un médico.

Beneficios

Los beneficios potenciales de su participación incluyen un incremento en el conocimiento sobre la prevención de la enfermedad de Chagas y la futura implementación de actividades de control e intervención, que tienen el potencial de mejorar la salud de su comunidad.

Declaración general de consentimiento: "Al firmar abajo, declaro que los investigadores a cargo de este proyecto me han explicado los propósitos y los beneficios y riesgos de la investigación, y que los he entendido plenamente. Entiendo claramente que no hay compensación monetaria por mi participación ni de parte de la Universidad de Ohio, ni de la PUCE ni de las otras instituciones implicadas, y/o de sus empleados, y que en caso de alguna lesión que pudiese sufrir por mi participación en esta investigación, se buscarán las prestaciones médicas necesarias sin costo para mí a través de las unidades del Ministerio de Salud". Al firmar abajo declaro que entiendo el alcance y los objetivos del Proyecto, y estoy dispuesto a participar voluntariamente.

Firma _____ Fecha: _____ de _____ del 201_

Firma del testigo (en caso de analfabetismo) _____ Fecha: _____ de _____ del 201_

Si tiene preguntas sobre esta investigación por favor comuníquese con el Lcdo. Esteban Baus, CIEI Universidad Católica del Ecuador. Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1700 ext. 1856. Fax. (02) 299 1689 Email: egbaus@puce.edu.ec

Si tiene preguntas sobre sus derechos como participante en esta investigación comuníquese con el Dr. Iván Carvajal, Comité de Ética, Universidad Católica del Ecuador Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1533 ext. . Fax. 02 299 1656 Email: ICARVAJAL@puce.edu.ec

Anexo 2. Encuesta de vivienda utilizada en el trabajo de campo.

| Encuesta de vivienda | | | |
|---|-------------------|--|-----------------------|
| Chagas en Ecuador | | | |
| # Estudio | B 0 | Grupo | |
| Fecha | | | 2 0 1 |
| | | Localidad | Cantón |
| | | Provincia | Código de la vivienda |
| Jefe de Familia | Nombres Apellidos | | |
| Sección A. Información geográfica | | Sección D. Intervención | |
| A1. Latitud (en grados decimales) | | D1. 1. ¿Ha fumigado Ud. Mismo su casa? | |
| A2. Longitud (en grados decimales) | | 1= SI | |
| A3. Altitud (en metros) | | 2= NO | |
| Sección B. Servicios | | D1.2. ¿Hace cuánto tiempo? | |
| B1. ¿Cuántos dormitorios tiene su casa? | | D2.1. ¿Ha fumigado el Servicio de la Malaria (SNEM) su casa? | |
| B2. ¿Cuántas personas duermen en la casa? | | 1= SI | |
| B3. ¿Tiene servicio higiénico en la casa? | | 2= NO | |
| 1= SI | | D2.2. ¿Hace cuánto tiempo? | |
| 2= NO | | Sección E. Tiene animales domésticos dentro o cerca de la casa | |
| Sección C. Material predominante de la casa | | E1.1. gallinas o palomas u otras aves? | |
| C1. Techo o cubierta | | 1= SI | |
| 1 Losa | | 2= NO | |
| 2 Asbesto o eternit | | E1.2. ¿Cuántas gallinas u otras aves? | |
| 3 Zinc | | | |
| 4 Teja | | E2.1. Perros? | |
| 5 Paja, palma, o similares | | 1= SI | |
| 6 Otros, especifique | | 2= NO | |
| C2. Paredes | | E2.2. ¿Cuántos perros? | |
| 1 Hormigón, ladrillo o bloque | | E3.1. cuyes? | |
| 2 Adobe o tapia | | 1= SI | |
| 3 Madera | | 2= NO | |
| 4 Caña guadua revestida | | E3.1. ¿Cuántos cuyes? | |
| 5 Bahareque | | | |
| 6 Caña guadua no revestida | | E3.1. gatos? | |
| C3. Piso | | 1= SI | |
| 1 Entablado rústico | | 2= NO | |
| 2 Parquet | | E3.2. ¿Cuántos gatos? | |
| 3 Baldosa o vinyl | | | |
| 4 Ladrillo o cemento | | Datos del responsable | |
| 5 Caña guadua | | Nombre | |
| 6 Tierra | | Firma | |
| 7 Otros materiales | | | |

Anexo 3. Ficha entomológica utilizada durante las búsquedas en el hábitat sinantrópico (domicilio y peridomicilio)

| Ficha Entomológica para visitas a casas | | | | | |
|---|--|--|---|---|--|
| Estudio <input type="text" value="B"/> <input type="text" value="0"/> | Grupo <input type="text"/> <input type="text"/> | Fecha <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text" value="2"/> <input type="text" value="0"/> <input type="text" value="1"/> | Localidad <input style="width: 100%;" type="text"/> | GPS <input style="width: 100%;" type="text"/> | Cantón <input style="width: 100%;" type="text"/> |
| Provincia <input style="width: 100%;" type="text"/> | Cámara <input style="width: 100%;" type="text"/> | Código de la casa <input style="width: 100%;" type="text"/> | | | |
| Jefe de Familia <input style="width: 100%;" type="text"/> <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> Nombres Apellidos </div> | | | | | |
| Sección A (la casa será considerada positiva cuando se encuentre un triatmino vivo) <input style="float: right;" type="checkbox"/> | | | | | |
| 1=Cerrada 2=Renuente 3=Deshabitada 4=No infestada 5=Infestada | | | | | |
| Sección B. Infestación intradomiciliar | | | Sección C. Infestación peridomiciliar | | |
| B1. Alguno de los triatminos fue encontrado en el intradomicilio? <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1=SI 2=NO | | | C1. Alguno de los triatminos fue encontrado en el peridomicilio? <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1=SI 2=NO | | |
| B2. Cuántos triatminos fueron encontrados en el intradomicilio Total <input style="width: 50px;" type="text"/> | | | C2. Cuántos triatminos fueron encontrados en el peridomicilio Total <input style="width: 50px;" type="text"/> | | |
| B3. Qué especie fue encontrada en el intradomicilio | | | C3. Qué especie fue encontrada en el peridomicilio | | |
| Especie <input style="width: 50px;" type="text"/> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>Huevos <input style="width: 50px;" type="text"/></div> <div>Ninfas <input style="width: 50px;" type="text"/></div> <div>Adultos <input style="width: 50px;" type="text"/></div> </div> | | | Especie <input style="width: 50px;" type="text"/> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>Huevos <input style="width: 50px;" type="text"/></div> <div>Ninfas <input style="width: 50px;" type="text"/></div> <div>Adultos <input style="width: 50px;" type="text"/></div> </div> | | |
| Huevos <input style="width: 50px;" type="text"/> Ninfas <input style="width: 50px;" type="text"/> Adultos <input style="width: 50px;" type="text"/> | | | Huevos <input style="width: 50px;" type="text"/> Ninfas <input style="width: 50px;" type="text"/> Adultos <input style="width: 50px;" type="text"/> | | |
| Huevos <input style="width: 50px;" type="text"/> Ninfas <input style="width: 50px;" type="text"/> Adultos <input style="width: 50px;" type="text"/> | | | Huevos <input style="width: 50px;" type="text"/> Ninfas <input style="width: 50px;" type="text"/> Adultos <input style="width: 50px;" type="text"/> | | |
| Huevos <input style="width: 50px;" type="text"/> Ninfas <input style="width: 50px;" type="text"/> Adultos <input style="width: 50px;" type="text"/> | | | Huevos <input style="width: 50px;" type="text"/> Ninfas <input style="width: 50px;" type="text"/> Adultos <input style="width: 50px;" type="text"/> | | |
| B4. Lugar exacto dónde se encontraron los triatminos. <input style="width: 100%;" type="text"/> | | | C4. Lugar exacto dónde se encontraron los triatminos <input style="width: 100%;" type="text"/> | | |
| Sección D. Rociamiento de la vivienda | | | CTR= numero de cargas para rociamiento <input style="width: 50px;" type="text"/> | | |
| D1. La casa fue rociada? <input style="float: right;" type="checkbox"/> 1=SI 2=NO | | | D3. Cuantos gramos de insecticida fueron utilizados <input style="width: 50px;" type="text"/> | | |
| D2. Cálculo de la carga total de insecticida CTR=4 x H x (A+L) + (1.5 x A x L) | | | D4. Nombre del Rociador <input style="width: 100%;" type="text"/> | | |
| A= ancho de la casa <input style="width: 50px;" type="text"/> | | | | | |
| H= alto de la casa <input style="width: 50px;" type="text"/> | | | | | |
| L= Largo de la casa <input style="width: 50px;" type="text"/> | | | | | |
| Datos del Responsable Nombre <input style="width: 100%;" type="text"/> | | | Firma <input style="width: 100%;" type="text"/> | | |

Anexo 4. Ficha de Visita. Esta ficha se coloca detrás de la puerta una vez terminado el trabajo de búsqueda en el ambiente sinantrópico (domicilio – peridomicilio).

**PROYECTO: EFECTIVIDAD DE LA ESTRATEGIA DEL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE
LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA PROVINCIA DE MANABÍ**

Universidad Católica, Universidad de Ohio, Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria y Plan Internacional

Provincia: _____ Cantón: _____

Barrio: _____ Localidad: _____

Código de la vivienda: _____

Nombre completo del Jefe de Familia: _____

| Fecha de Visita | Actividad | Inspector |
|------------------------|------------------|------------------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

FIRMA RESPONSABLE

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja.

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (O) | Latitud (S) | Altitud (m.s.n.m) |
|---|--------------------------------|--------------------|---------------|------------|---|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|--------------|-------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 1 | ND2704 | ND402 | Naranjo Dulce | Domiciliar | Cuarto Nido de ardilla en planta de chirimoyo | 12/07/2006 | | X | | X | H | -79,70702 | -4,06891 | 1367 |
| 2 | ND2712 | NDN209 | Naranjo Dulce | Silvestre | Nido de ardilla en planta de chirimoyo | 12/07/2006 | X | X | X | X | M | -79,70090 | -4,07885 | 1303 |
| 3 | ND2713 | NDN405 | Naranjo Dulce | Silvestre | Nido de ardilla en planta de chirimoyo | 12/07/2006 | X | X | | X | H | -79,69922 | -4,07609 | 1210 |
| 4 | ND2823 | NDN405 | Naranjo Dulce | Silvestre | Nido de ardilla en planta de chirimoyo | 13/07/2006 | | X | X | X | H | -79,69922 | -4,07609 | 1210 |
| 5 | ND2824 | NDN405 | Naranjo Dulce | Silvestre | Nido de Ardilla en planta de chirimoyo | 13/07/2006 | | X | | X | H | -79,69922 | -4,07609 | 1210 |
| 6 | ND3358 | NDN404 | Naranjo Dulce | Silvestre | Nido de ardilla en planta de chirimoyo | 13/07/2006 | X | X | | X | M | -79,69913 | -4,07622 | 1213 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...)

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (O) | Latitud (S) | Altitud (m.s.n.m) |
|----|--------------------------------|--------------------|---------------|----------------|------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|--------------|-------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 7 | ND3509 | ND401 | Naranjo Dulce | Domiciliar | Cama | 13/07/2006 | X | X | | X | H | -79,70602 | -4,06901 | 1376 |
| 8 | SS2967 | SS304 | Santa Rosa | Domiciliar | Cama | 22/07/2006 | | X | X | X | H | -79,40531 | -4,39761 | 1421 |
| 9 | SS2689 | SS104 | Santa Rosa | Domiciliar | Dormitorio | 24/04/2007 | X | X | | X | H | -79,41757 | -4,39786 | 1287 |
| 10 | SS3038 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | X | X | | X | H | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 11 | SS3039 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | | | X | X | M | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 12 | SS3040 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | X | X | | X | M | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 13 | SS3041 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | X | X | | X | M | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 14 | SS3042 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | X | X | | X | M | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 15 | SS3043 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | X | X | X | X | M | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 16 | SS3464 | SS507 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/08/2007 | X | X | X | X | H | -79,40589 | -4,39236 | 1391 |
| 17 | SS3465 | SS507 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/08/2007 | X | X | X | X | M | -79,40589 | -4,39236 | 1391 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...)

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (M/H) | Longitud (O) | Latitud (S) | Altitud (m.s.n.m) |
|----|--------------------------------|--------------------|-------------|----------------|------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|--------------|-------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 18 | SS3468 | SS501 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/08/2007 | X | X | | X | M | -79,40117 | -4,39549 | 1511 |
| 19 | SS3470 | SS105 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/08/2007 | | | | X | H | -79,41600 | -4,39696 | 1329 |
| 20 | SS3471 | SS105 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/08/2007 | X | X | | X | M | -79,41600 | -4,39696 | 1329 |
| 21 | SS3474 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/08/2007 | X | X | | X | H | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 22 | SS3475 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/08/2007 | X | X | | X | H | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 23 | SS3476 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/08/2007 | X | X | X | X | M | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 24 | SS3477 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/08/2007 | X | X | | X | H | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 25 | SS3478 | SS602 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/08/2007 | | | | X | H | -79,38939 | -4,39580 | 1636 |
| 26 | SSN3510 | SSN5 | Santa Rosa | Silvestre | Nido de ardilla | 20/03/2007 | X | X | | X | H | -79,41020 | -4,39712 | 1400 |
| 27 | SSN3511 | SSN5 | Santa Rosa | Silvestre | Nido de ardilla | 20/03/2007 | X | X | | X | M | -79,41020 | -4,39712 | 1400 |
| 28 | SSN3512 | SSN6 | Santa Rosa | Silvestre | Nido de ardilla | 20/03/2007 | X | | | X | M | -79,40922 | -4,39633 | 1376 |
| 29 | SSN3513 | SSN8 | Santa Rosa | Silvestre | Nido de ardilla | 20/03/2007 | X | X | X | X | M | -79,40745 | -4,39801 | 1329 |
| 30 | SSN3514 | SSN8 | Santa Rosa | Silvestre | Nido de ardilla | 20/03/2007 | X | X | X | X | H | -79,40745 | -4,39801 | 1329 |
| 31 | SSN3515 | SSN9 | Santa Rosa | Silvestre | Nido de ardilla | 20/03/2007 | | | | X | H | -79,40754 | -4,39853 | 1329 |
| 32 | SSN3516 | SSN9 | Santa Rosa | Silvestre | Nido de ardilla | 20/03/2007 | X | X | | X | H | -79,40754 | -4,39853 | 1319 |
| 33 | ST2972 | ST305 | Santa Ester | Domiciliar | Cama | 12/07/2007 | | X | X | X | M | -79,42511 | -4,37836 | 1219 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia Loja (continuación...)

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (O) | Latitud (S) | Altitud (m.s.n.m) |
|----|--------------------------------|--------------------|---------------------------|----------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|--------------|-------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 34 | ST2973 | ST306 | Santa Ester | Domiciliar | Cama | 12/07/2007 | | X | | X | M | -79,42646 | -4,378 | 1224 |
| 35 | AH2404 | AH202 | Ashimingo Vega del Carmen | Domiciliar | Llegó volando Dentro de la casa | 20/02/2007 | X | X | X | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 36 | VC3047 | VC501 | | Domiciliar | Dentro de la casa | 11/07/2007 | X | X | | X | M | -79,59096 | -4,11502 | 1057 |
| 37 | LM2456 | LM301 | Limón | Domiciliar | Cuyera dentro de la casa | 11/07/2007 | | X | X | X | H | -79,80624 | -4,04674 | 1115 |
| 38 | LM2457 | LM301 | Limón | Domiciliar | | 11/07/2007 | | X | | X | H | -79,80624 | -4,04674 | 1115 |
| 39 | TR2813 | TR405 | Tuburo | Domiciliar | Cama | 24/04/2007 | X | X | X | X | H | -79,42495 | -4,37783 | 1221 |
| 40 | CG2319 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | X | X | X | H | -80,08701 | -4,1963 | 826 |
| 41 | CG2320 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | X | X | X | H | -80,08701 | -4,1963 | 826 |
| 42 | CG2332 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | X | | X | H | -80,08701 | -4,1963 | 826 |
| 43 | CG2333 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | X | X | X | M | -80,08701 | -4,1963 | 826 |
| 44 | CG2334 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | X | X | X | H | -80,08701 | -4,1963 | 826 |
| 45 | CG2335 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | X | | X | M | -80,08701 | -4,1963 | 826 |
| 46 | CG2336 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | N. de paloma | 14/07/2005 | | | | X | H | -80,08701 | -4,1963 | 826 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...)

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | Sexo (H/M) | Longitud (O) | Latitud (S) | Altitud (m.s.n.m) |
|----|--------------------------------|--------------------|------------|----------------|---------------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|----------------------------|------------|--------------|-------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | | | | | |
| | | | | | | | | mt Cyt b | | | | | |
| | | | | | | | | | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 47 | CG2337 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | X | X | X | H | -80,08701 | -4,1963 826 |
| 48 | CG2338 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | X | X | X | H | -80,08701 | -4,1963 826 |
| 49 | CG2339 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | X | X | | X | H | -80,08701 | -4,1963 826 |
| 50 | CG2401 | CG003 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de gallina Volando trampa de luz | 15/07/2006 | X | X | X | X | H | -80,08878 | -4,20013 861 |
| 51 | CG2405 | S/N | La Ciénega | Silvestre | Nido de gallina | 12/08/2005 | X | X | X | X | M | -80,10392 | -4,21483 762 |
| 52 | CG2406 | CG003 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de gallina | 15/07/2006 | | | | X | M | -80,08878 | -4,20013 861 |
| 53 | CG2433 | CGN506 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | | X | X | X | M | -80,10400 | -4,21484 755 |
| 54 | CG2640 | CGN506 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | | | X | X | H | -80,10400 | -4,21484 755 |
| 55 | CG2641 | CGN506 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | | X | | X | H | -80,10400 | -4,21484 755 |
| 56 | CG2642 | CGN506 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | | X | X | X | M | -80,10400 | -4,21484 755 |
| 57 | CG2818 | CG 406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de Gallina | 12/07/2005 | | | | X | M | -80,08878 | -4,20013 861 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...).

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (O) | Latitud (S) | Altitud (m.s.n.m) |
|----|--------------------------------|--------------------|------------|------------|------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|--------------|-------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 58 | CG2838 | CGN602 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | | X | | X | H | 80,10400 | -4,21362 | 759 |
| 59 | CG2839 | CGN602 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | X | X | X | X | M | 80,10400 | -4,21362 | 759 |
| 60 | CG2840 | CGN602 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | | X | | X | M | 80,10400 | -4,21362 | 759 |
| 61 | CG2841 | CGN602 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | | X | | X | H | 80,10400 | -4,21362 | 759 |
| 62 | CG2842 | CGN602 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | | X | X | X | M | 80,10400 | -4,21362 | 759 |
| 63 | CG2843 | CGN607 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | | X | | X | M | 80,10367 | -4,21727 | 830 |
| 64 | CG2844 | CGN607 | La Ciénega | Silvestre | Nido de Ardilla | 15/07/2006 | | X | | X | M | 80,10367 | -4,21727 | 830 |
| 65 | CG2964 | CG 408 | La Ciénega | Domiciliar | dormitorio | 12/08/2005 | | X | | X | M | -80,0879 | -4,19812 | 853 |
| 66 | CG3479 | CGN-1 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 12/08/2005 | X | X | | X | H | 80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 67 | CG3480 | CGN-1 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 16/08/2007 | X | X | X | X | H | 80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 68 | CG3481 | CGN-1 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 16/08/2007 | X | X | | X | H | 80,10383 | -4,21336 | 768 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...).

| N | Código del Insectario -UEM- CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|----|-------------------------------------|--------------------|---------------|----------------|------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 81 | EX3011 | EX401 | La Extensa | Domiciliar | Cuyera | 04/07/2007 | X | X | X | X | M | -79,36064 | -4,04102 | 1262 |
| 82 | EX3012 | EX401 | La Extensa | Domiciliar | Cuyera | 04/07/2007 | | | X | X | H | -79,36064 | -4,04102 | 1262 |
| 83 | TR5001 | TRN7 | Tuburo | Silvestre | Nido de ardilla | 14/03/2007 | | X | X | X | H | 79,42348 | -4,3789 | 1211 |
| 84 | TR5002 | TRN7 | Tuburo | Silvestre | Nido de ardilla | 14/03/2007 | | X | X | X | M | 79,42348 | -4,37894 | 1211 |
| 85 | CG5004 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2007 | X | X | | X | H | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 86 | CG5005 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2007 | X | X | | X | M | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 87 | AH5006 | AH304 | Ashimingo | Domiciliar | Domicilio | 10/08/2005 | X | X | X | X | H | -79,72719 | -4,04928 | 1002 |
| 88 | AH5007 | AH302 | Ashimingo | Domiciliar | Domicilio | 10/08/2005 | | | X | X | H | -79,72634 | -4,05648 | 1114 |
| 89 | AH5008 | AH302 | Ashimingo | Domiciliar | Domicilio | 10/08/2005 | X | X | X | X | M | -79,72634 | -4,05648 | 1114 |
| 90 | AH5009 | AH302 | Ashimingo | Domiciliar | Domicilio | 10/08/2005 | | X | X | X | M | -79,72634 | -4,05648 | 1114 |
| 91 | AH5010 | AH201 | Ashimingo | Domiciliar | Domicilio | 10/08/2005 | | X | X | X | M | -79,72964 | -4,05654 | 1046 |
| 92 | AH5047 | AH201 | Ashimingo | Domiciliar | Domicilio | 10/08/2005 | | | X | X | M | -79,72964 | -4,05654 | 1046 |
| 93 | AH5048 | AH201 | Ashimingo | Domiciliar | Domicilio | 10/08/2005 | X | X | X | X | H | -79,72964 | -4,05654 | 1046 |
| 94 | AB5049 | AB201 | Algarrobbillo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 15/07/2005 | | | | X | M | -80,05955 | -4,17334 | 778 |
| 95 | AB5050 | AB201 | Algarrobbillo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 15/07/2005 | | | | X | H | -80,05955 | -4,17334 | 778 |
| 96 | GL5051 | GL108 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2007 | | | X | X | M | -79,43299 | -4,34198 | 1358 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...).

| N | Código del Insectario -UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Habitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud N/S | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|------------------------------------|--------------------|---------------|----------------|------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------|-------------------|----------------|----------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 97 | GL5052 | GL108 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2007 | | | X | X | M | -79,43299 | -4,34198 | 1358 |
| 98 | GL5053 | GL602 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2007 | | | X | X | H | -79,43281 | -4,33788 | 1392 |
| 99 | GL5054 | GL602 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2007 | X | X | | X | M | -79,43281 | -4,33788 | 1392 |
| 100 | CG5055 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | X | X | | X | H | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 101 | CG5056 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | X | X | X | X | H | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 102 | CG5057 | CG004 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | | X | M | -80,10394 | -4,21480 | 775 |
| 103 | CG5058 | CG004 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | | X | M | -80,10394 | -4,21480 | 775 |
| 104 | AB5059 | AB102 | Algarrobbillo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 15/07/2008 | | | | X | H | -80,07395 | -4,17424 | 744 |
| 105 | AB5060 | AB102 | Algarrobbillo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 16/07/2008 | | | X | X | H | -80,07395 | -4,17424 | 744 |
| 106 | CG5061 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | X | X | X | X | M | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 107 | CG5062 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | X | X | X | X | H | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 108 | CG5063 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | X | X | X | M | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 109 | CG5064 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | | | X | H | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 110 | CG5065 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | | | X | H | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 111 | CG5066 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | X | X | X | X | H | -80,08878 | -4,20013 | 861 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...).

| N | Código del Insectario -UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (S/N) | Altitud (msnm) |
|-----|------------------------------------|--------------------|------------|----------------|------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 112 | CG5067 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | | | X | H | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 113 | CG5068 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | | X | X | H | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 114 | CG5069 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | | | X | M | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 115 | CG5070 | CG406 | La Ciénega | Peridomiciliar | Nido de paloma | 14/07/2005 | | | | X | H | -80,08878 | -4,20013 | 861 |
| 116 | AH5071 | AH504 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de paloma | 30/08/2005 | | | | X | M | -79,72928 | -4,05597 | 1102 |
| 117 | AH5072 | AH504 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de paloma | 30/08/2005 | | | | X | M | -79,72928 | -4,05597 | 1102 |
| 118 | AH5073 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | | X | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 119 | AH5074 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | X | X | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 120 | AH5075 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | X | X | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 122 | AH5077 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | | X | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 123 | AH5078 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | | | X | H | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 124 | AH5079 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | | | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...).

| N | Código del Insectario -UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|------------------------------------|--------------------|------------|----------------|------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|---------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 125 | AH5080 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | | | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 126 | AH5081 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | | | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 127 | AH5082 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | | X | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 128 | AH5083 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | | X | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 129 | AH5084 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | | X | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 130 | AH5085 | AH202 | Ashimingo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 10/08/2005 | | | X | X | M | -79,73944 | -4,04458 | 871 |
| 131 | GL5086 | GL108 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2006 | | | | X | H | -79,43299 | -4,34198 | 1358 |
| 132 | GL5087 | GL108 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2006 | | | | X | H | -79,43299 | -4,34198 | 1358 |
| 133 | GL5088 | GL108 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2006 | | X | X | X | H | -79,43299 | -4,34198 | 1358 |
| 134 | GL5089 | GL108 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2006 | | | X | X | M | -79,43299 | -4,34198 | 1358 |
| 135 | GL5090 | GL108 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2006 | | | X | X | H | -79,43299 | -4,34198 | 1358 |
| 136 | GL5091 | GL108 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2006 | | | | X | M | -79,43299 | -4,34198 | 1358 |
| 137 | GL5092 | GL108 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2006 | | | | X | M | -79,43299 | -4,34198 | 1358 |
| 138 | GL5093 | GL108 | Galápagos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 21/07/2006 | | | X | X | H | -79,43299 | -4,34198 | 1358 |
| 139 | SS5094 | SS509 | Santa Rosa | Domiciliar | Cama | 22/07/2006 | X | X | X | X | M | -79,40566 | -4,3942 | 1384 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...).

| N | Código del Insectario -UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|------------------------------------|--------------------|------------|----------------|------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 140 | SS5095 | SS304 | Santa Rosa | Domiciliar | Cama | 22/07/2006 | X | | X | X | M | -79,40531 | -4,39761 | 1421 |
| 141 | SS5096 | SS304 | Santa Rosa | Domiciliar | Cama | 22/07/2006 | X | X | X | X | H | -79,40531 | -4,39761 | 1421 |
| 142 | EX5097 | EX401 | La Extensa | Domiciliar | Cuyera | 22/07/2006 | X | X | X | X | M | -79,36064 | -4,04102 | 1262 |
| 143 | EX5098 | EX401 | La Extensa | Domiciliar | Cuyera | 22/07/2006 | X | X | X | X | M | -79,36064 | -4,04102 | 1262 |
| 144 | EX5099 | EX401 | La Extensa | Domiciliar | Cuyera | 22/07/2006 | | X | X | X | M | -79,36064 | -4,04102 | 1262 |
| 145 | EX5100 | EX401 | La Extensa | Domiciliar | Cuyera | 22/07/2006 | | X | X | X | M | -79,36064 | -4,04102 | 1262 |
| 146 | EX5101 | EX401 | La Extensa | Domiciliar | Cuyera | 22/07/2006 | | X | X | X | H | -79,36064 | -4,04102 | 1262 |
| 147 | HY5102 | HY107 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 05/07/2007 | | | X | X | H | -79,33931 | -4,09456 | 1256 |
| 148 | HY5103 | HY107 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 05/07/2007 | | | X | X | H | -79,33931 | -4,09456 | 1256 |
| 149 | HY5104 | HY306 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | X | X | X | H | -79,34805 | -4,09395 | 1228 |
| 150 | HY5105 | HY306 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | X | X | X | H | -79,34805 | -4,09395 | 1228 |
| 151 | HY5106 | HY306 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | | X | X | M | -79,34805 | -4,09395 | 1228 |
| 152 | HY5107 | HY306 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | X | X | X | H | -79,34805 | -4,09395 | 1228 |
| 153 | HY5108 | HY306 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | X | X | X | H | -79,34805 | -4,09395 | 1228 |
| 154 | HY5109 | HY306 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | X | X | X | M | -79,34805 | -4,09395 | 1228 |
| 155 | HY5110 | HY609 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | | X | X | M | -79,34282 | -4,10128 | 1231 |
| 156 | HY5111 | HY609 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | | | X | M | -79,34282 | -4,10128 | 1231 |
| 157 | HY5112 | HY609 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | | | X | H | -79,34282 | -4,10128 | 1231 |
| 158 | HY5113 | HY609 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | | X | X | M | -79,34282 | -4,10128 | 1231 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...).

| N | Código del Insectario -UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|------------------------------------|--------------------|------------------|----------------|---------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 159 | HY5114 | HY609 | El Huayco | Peridomiciliar | Nido de gallina | 24/06/2006 | | | X | X | M | -79,34282 | -4,10128 | 1231 |
| 160 | ND5115 | ND703 | Naranjo Dulce | Peridomiciliar | Nido de gallina | 14/07/2007 | | | | X | H | -79,70243 | -4,06381 | 1167 |
| 161 | ND5116 | ND703 | Naranjo Dulce | Peridomiciliar | Nido de gallina | 14/07/2007 | | | | X | H | -79,70243 | -4,06381 | 1167 |
| 162 | ND5117 | ND703 | Naranjo Dulce | Peridomiciliar | Nido de gallina | 14/07/2007 | | | | X | M | -79,70243 | -4,06381 | 1167 |
| 163 | ND5118 | ND703 | Naranjo Dulce | Peridomiciliar | Nido de gallina | 14/07/2007 | | | | X | M | -79,70243 | -4,06381 | 1167 |
| 164 | TR5119 | TR106 | Tuburo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 30/07/2005 | | X | | X | H | -79,42748 | -4,37399 | 1236 |
| 165 | TR5120 | TR106 | Tuburo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 30/07/2005 | | X | X | X | H | -79,42748 | -4,37399 | 1236 |
| 166 | TR5121 | TR106 | Tuburo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 30/07/2005 | | X | X | X | M | -79,42748 | -4,37399 | 1236 |
| 167 | TR5122 | TR106 | Tuburo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 30/07/2005 | | | | X | M | -79,42748 | -4,37399 | 1236 |
| 168 | TR5123 | TR106 | Tuburo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 30/07/2005 | | X | | X | H | -79,42748 | -4,37399 | 1236 |
| 169 | SS5124 | SS501 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | | X | | X | H | -79,40117 | -4,39549 | 1511 |
| 170 | ST5125 | ST301 | Santa Ester | Peridomiciliar | Nido de rata en bodega | 12/07/2007 | | X | | X | M | -79,55072 | -4,12323 | 1103 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...).

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|--------------------------------|--------------------|-------------|----------------|------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|----------------|---------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 171 | ST5126 | ST301 | Santa Ester | Peridomiciliar | Nido de rata en bodega | 12/07/2007 | | | X | X | H | -79,55072 | -4,12323 | 1103 |
| 172 | ST5127 | ST301 | Santa Ester | Peridomiciliar | Nido de rata en bodega | 12/07/2007 | | | X | X | M | -79,55072 | -4,12323 | 1103 |
| 173 | ST5128 | ST301 | Santa Ester | Peridomiciliar | Nido de rata en bodega | 12/07/2007 | | | | X | H | -79,55072 | -4,12323 | 1103 |
| 174 | SS5129 | SS507 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de paloma | 17/07/2007 | | X | | X | H | -79,40589 | -4,39236 | 1391 |
| 175 | BR5130 | BR304 | Bramaderos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 09/07/2007 | | X | | X | M | -79,84622 | -4,07672 | 1301 |
| 176 | BR5131 | BR304 | Bramaderos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 09/07/2007 | | X | | X | H | -79,84622 | -4,07672 | 1301 |
| 177 | BR5132 | BR304 | Bramaderos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 09/07/2007 | | | | X | H | -79,84622 | -4,07672 | 1301 |
| 178 | BR5133 | BR534 | Bramaderos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 09/07/2007 | | | | X | H | -79,80719 | -4,07567 | 897 |
| 179 | BR5134 | BR534 | Bramaderos | Peridomiciliar | Nido de gallina | 09/07/2007 | | | | X | H | -79,80719 | -4,07567 | 897 |
| 180 | SS5135 | SS507 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | | X | | X | M | -79,40589 | -4,39236 | 1391 |
| 181 | SS5136 | SS507 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | | X | | X | M | -79,40589 | -4,39236 | 1391 |
| 182 | SS5137 | SS501 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | | | | X | H | -79,40117 | -4,39549 | 1511 |
| 183 | SS5138 | SS507 | Santa Rosa | Peridomiciliar | Nido de gallina | 17/07/2007 | | X | | X | M | -79,40589 | -4,39236 | 1391 |
| 184 | EX5139 | EX604 | La Extensa | Domiciliar | Cuyera | 04/07/2007 | | | X | X | H | -79,36067 | -4,04497 | 1271 |
| 185 | EX5140 | EX604 | La Extensa | Domiciliar | Cuyera | 04/07/2007 | | | X | X | M | -79,36067 | -4,04497 | 1271 |
| 186 | CG5151 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | X | X | X | X | H | -80,10383 | -4,21336 | 768 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación...).

| N | Código del Insectario -UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|------------------------------------|--------------------|------------|------------|------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 187 | CG5152 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | X | X | X | X | M | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 188 | CG5153 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | X | X | X | X | M | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 189 | CG5154 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | | X | H | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 190 | CG5155 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | X | X | X | X | M | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 191 | CG5156 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | | X | H | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 192 | CG5157 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | | X | H | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 193 | CG5158 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | | X | M | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 194 | CG5159 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | | X | M | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 195 | CG5160 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | | X | M | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 196 | CG5161 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | | | X | M | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 197 | CG5162 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | | X | M | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 198 | CG5163 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | X | X | H | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 199 | CG5164 | CG001 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | X | X | H | -80,10383 | -4,21336 | 768 |
| 200 | CG5165 | CG004 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | | X | M | -80,10394 | -4,21480 | 775 |
| 201 | CG5166 | CG009 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | X | X | H | -80,10397 | -4,21484 | 763 |
| 202 | CG5167 | CG009 | La Ciénega | Silvestre | Nido de ardilla | 15/07/2005 | | X | X | X | M | -80,10397 | -4,21484 | 763 |
| 203 | GL1385 | GL502 | Galápagos | Domiciliar | Cama | 21/07/2006 | | X | X | X | H | -79,43851 | -4,35221 | 1259 |

Anexo 8. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Loja (continuación).

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|--------------------------------|--------------------|------------|------------|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|----------------|---------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 204 | TR1426 | TR407 | Tuburo | Domiciliar | Sábana de la cama | 28/07/2006 | | X | | X | M | -79,42491 | -4,37537 | 1259 |
| 205 | TR1427 | TR407 | Tuburo | Domiciliar | Sábana de la cama | 28/07/2006 | | X | X | X | M | -79,42491 | -4,37537 | 1259 |
| 206 | TR1428 | TR407 | Tuburo | Domiciliar | Sábana de la cama | 28/07/2006 | | X | X | X | M | -79,42491 | -4,37537 | 1259 |
| 207 | BR1727 | BR303 | Bramaderos | Domiciliar | Cama | 18/07/2006 | | X | X | X | M | -79,84645 | -4,07582 | 1307 |
| 208 | BR1728 | BR303 | Bramaderos | Domiciliar | Cama | 18/07/2006 | | X | X | X | H | -79,84645 | -4,07582 | 1307 |

Anexo 9. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Manabí (continuación).

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|--------------------------------|--------------------|---------------|----------------|----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|----------------|---------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 209 | MB5003 | MB216 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Nido de gallina | 23/07/2007 | X | X | X | X | H | -80,36935 | -1,08556 | 132 |
| 210 | MB5011 | MB308 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Nido de rata | 23/07/2007 | X | X | X | X | H | -80,37745 | -1.08215 | 123 |
| 211 | MB5012 | MBN6-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de rata en cade | 23/07/2007 | X | X | X | X | H | -80,35293 | -1,09027 | 262 |
| 212 | BJ5013 | BJ310 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata | 25/06/2007 | | X | X | X | H | -80,34322 | -0.96849 | 143 |
| 213 | BJ5014 | BJ310 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata | 25/06/2007 | | | | X | H | -80,34322 | -0.96849 | 143 |
| 214 | BJ5015 | BJ310 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata | 25/06/2007 | X | X | | X | H | -80,34322 | -0.96849 | 143 |
| 215 | BJ5016 | BJ310 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata | 25/06/2007 | | X | X | X | H | -80,34322 | -0.96849 | 143 |
| 216 | ZP5017 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | nido de zorro | 01/09/2006 | X | X | X | X | M | -80,21398 | -1.01332 | 52 |
| 217 | ZP5018 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | nido de zorro | 01/09/2006 | X | X | | X | M | -80,21398 | -1.01332 | 52 |
| 218 | ZP5019 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | nido de zorro | 01/09/2006 | | | | X | H | -80,21398 | -1.01332 | 52 |
| 219 | ZP5020 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | nido de zorro | 01/09/2006 | X | X | | X | M | -80,21398 | -1.01332 | 52 |
| 220 | ZP5021 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | nido de zorro | 01/09/2006 | X | X | X | X | H | -80,21398 | -1.01332 | 52 |
| 221 | ZP5022 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | nido de zorro | 01/09/2006 | X | X | X | X | H | -80,21398 | -1.01332 | 52 |
| 222 | ZP5023 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | nido de zorro | 01/09/2006 | X | X | X | X | M | -80,21398 | -1.01332 | 52 |

Anexo 9. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Manabí (continuación...).

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|--------------------------------|--------------------|---------------|----------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|----------------|---------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 223 | MB5024 | MBN48-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla | 23/06/2007 | | X | | X | H | -80,34830 | -1,09275 | 386 |
| 224 | MB5025 | MBN40-3 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla | 23/06/2007 | X | X | X | X | M | -80,35027 | -1,09304 | 332 |
| 225 | MB5026 | MBN12-4 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ratón en coroso | 23/07/2007 | | X | X | X | M | -80,35114 | -1,09109 | 318 |
| 226 | MB5027 | MB215 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | entre maderas | 23/07/2007 | X | X | X | X | M | -80,36863 | -1,08542 | 141 |
| 227 | MB5028 | MBN48-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla | 23/06/2007 | | X | X | X | H | -80,34830 | -1,09275 | 386 |
| 228 | MB5029 | MBN43-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla | 23/06/2007 | X | X | X | X | H | -80,35293 | -1,09108 | 241 |
| 229 | MB5030 | MBN43-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla | 23/06/2007 | X | X | X | X | H | -80,35293 | -1,09108 | 241 |
| 230 | BJ5031 | BJN12-1 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | X | X | X | X | H | -80,33049 | -0,95838 | 239 |
| 231 | CA5032 | CA315 | Cruz Alta | Peridomiciliar | En leña | 18/06/2007 | X | X | X | X | H | -80,26371 | -1,00157 | 147 |
| 232 | LE5033 | LE442 | La Encantada | Peridomiciliar | nido de gallina | 21/06/2007 | | X | | X | H | -80,34132 | -0,99554 | 94 |
| 233 | JM5034 | JM401 | Jesús María | Peridomiciliar | Pila de cade | 25/07/2007 | | X | | X | H | -80,22012 | -1,02863 | 102 |
| 234 | JM5035 | JM401 | Jesús María | Peridomiciliar | Pila de cade | 25/07/2007 | | X | | X | M | -80,22012 | -1,02863 | 102 |
| 235 | JM5036 | JM101 | Jesús María | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 25/07/2007 | X | X | X | X | H | -80,21724 | -1,02346 | 119 |

Anexo 9. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Manabí (continuación...).

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|--------------------------------|--------------------|---------------|----------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|----------------|---------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 236 | JM5037 | JM125 | Jesús María | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 25/07/2007 | X | X | X | X | H | -80,22521 | -1,02201 | 128 |
| 237 | JM5038 | JM209 | Jesús María | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 25/07/2007 | | X | X | X | M | -80,22647 | -1,02872 | 75 |
| 238 | JM5039 | JM301 | Jesús María | Peridomiciliar | Nido de gallina | 25/07/2007 | X | X | X | X | M | -80,22432 | -1,02781 | 75 |
| 239 | JM5040 | JM301 | Jesús María | Peridomiciliar | Nido de gallina | 25/07/2007 | X | X | X | X | H | -80,22432 | -1,02781 | 75 |
| 240 | JM5041 | JM301 | Jesús María | Peridomiciliar | Nido de gallina | 25/07/2007 | | X | | X | H | -80,22432 | -1,02781 | 75 |
| 241 | JM5042 | JM301 | Jesús María | Peridomiciliar | nido de gallina | 25/07/2007 | | X | | X | M | -80,22432 | -1,02781 | 75 |
| 242 | JM5043 | JM301 | Jesús María | Peridomiciliar | nido de gallina | 25/07/2007 | | X | | X | H | -80,22432 | -1,02781 | 75 |
| 243 | JM5044 | JM301 | Jesús María | Peridomiciliar | nido de gallina | 25/07/2007 | | X | | X | H | -80,22432 | -1,02781 | 75 |
| 244 | JM5045 | JM301 | Jesús María | Peridomiciliar | nido de gallina | 25/07/2007 | X | X | X | X | H | -80,22432 | -1,02781 | 75 |
| 245 | BJ5046 | BJN11-1 | Bejuco | Silvestre | Nido de ratón en coroso | 21/06/2007 | X | X | | X | H | -80,32834 | -0,95976 | 234 |
| 246 | MB5141 | MBN6-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de rata en palma | 23/07/2007 | X | X | X | X | H | -80,35293 | -1,09027 | 262 |
| 247 | MB5142 | MBN6-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de rata en palma | 23/07/2007 | X | X | X | X | H | -80,35293 | -1,09027 | 262 |
| 248 | MB5143 | MBN6-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de rata en palma | 23/07/2007 | | X | | X | M | -80,35293 | -1,09027 | 262 |
| 249 | MB5144 | MBN6-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de rata en palma | 23/07/2007 | X | X | X | X | H | -80,35293 | -1,09027 | 262 |

Anexo 9. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Manabí (continuación...).

| N | Código del Insectario -UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | | | Análisis del Genotipo | | | |
|-----|------------------------------------|-----------------------|-----------|----------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------|-------------------------------|--------------------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
| 250 | BJ5145 | BJ203 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 25/06/2007 | X | X | X | X | M | -80,33247 | -0,95247 | 334 |
| 251 | BJ5146 | BJ203 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 25/06/2007 | X | X | | X | M | -80,33247 | -0,95247 | 334 |
| 252 | BJ5147 | BJ401 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 25/06/2007 | | | | X | H | -80,34809 | -0,99255 | 73 |
| 253 | BJ5148 | BJ203 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 25/06/2007 | X | X | X | X | M | -80,33247 | -0,95247 | 334 |
| 254 | BJ5149 | BJ203 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 25/06/2007 | | X | | X | M | -80,33247 | -0,95247 | 334 |
| 255 | BJ5150 | BJN19-6 | Bejuco | Silvestre | Nido de rata | 21/06/2007 | | X | | X | M | -80,33058 | -0,9584 | 234 |
| 256 | BJ2491 | BJ227 | Bejuco | Peridomiciliar | piñuelas | 25/06/2007 | | X | | X | M | -80,34700 | -0,97296 | 126 |
| 257 | BJ2953 | BJ401 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata | 25/06/2007 | | X | X | X | M | -80,34809 | -0,99255 | 73 |
| 258 | ZP3023 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | Nido de rata | 01/09/2006 | | X | | X | H | -80,21398 | -1,01332 | 52 |
| 259 | ZP3024 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | Nido de rata | 01/09/2006 | | X | X | X | H | -80,21398 | -1,01332 | 52 |
| 260 | ZP3025 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | Nido de rata | 01/09/2006 | | X | | X | H | -80,21398 | -1,01332 | 52 |
| 261 | ZP3026 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | Nido de rata | 01/09/2006 | | X | | X | M | -80,21398 | -1,01332 | 52 |
| 262 | NA3030 | NA | Naranjo | Peridomiciliar | Nido y conejera | 01/03/2007 | | X | | X | M | -80,2282 | -0.963 | 290 |
| 263 | NA3031 | NA | Naranjo | Peridomiciliar | Nido y conejera | 01/03/2007 | | X | | X | H | -80,2282 | -0.963 | 290 |
| 264 | NA3032 | NA | Naranjo | Peridomiciliar | Nido y conejera | 01/03/2007 | | X | X | X | H | -80,2282 | -0.963 | 290 |
| 265 | NA3033 | NA | Naranjo | Peridomiciliar | Nido y conejera | 01/03/2007 | | X | | X | M | 80.2282° | -0.963 | 290 |
| 266 | NA3034 | NA | Naranjo | Peridomiciliar | Nido y conejera | 01/03/2007 | | X | X | X | M | 80.2282° | -0.963 | 290 |

Anexo 9. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Manabí (continuación...).

| N | Código del Insectario -UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|------------------------------------|-----------------------|---------------|----------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 267 | CA3064 | CA306 | Cruz Alta | Peridomiciliar | Nido de rata en madera | 18/06/2007 | | X | | X | M | -80,25127 | -1,0055 | 135 |
| 268 | CA3068 | CA306 | Cruz Alta | Peridomiciliar | Nido de rata en madera | 18/06/2007 | | | | X | M | -80,25127 | -1,0055 | 135 |
| 269 | BJ3089 | BJ401 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata | 25/06/2007 | | X | | X | M | -80,34809 | -0,99255 | 73 |
| 270 | BJ3090 | BJ401 | Bejuco | Peridomiciliar | Nido de rata | 25/06/2007 | | X | | X | H | -80,34809 | -0,99255 | 73 |
| 271 | BJ3092 | BJN41-4 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | | X | X | M | -80,32982 | -0,95983 | 223 |
| 272 | BJ3093 | BJN41-4 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | X | X | X | X | H | -80,32982 | -0,95983 | 223 |
| 273 | BJ3094 | BJN11-1 | Bejuco | Silvestre | Nido de ratón en coroso | 21/06/2007 | | X | X | X | M | -80,32834 | -0,95976 | 234 |
| 274 | BJ3095 | BJN11-1 | Bejuco | Silvestre | Nido de ratón en coroso | 21/06/2007 | | X | | X | M | -80,32834 | -0,95976 | 234 |
| 275 | BJ3096 | BJN41-2 | Bejuco | Silvestre | Nido de ratón en coroso | 21/06/2007 | | X | | X | H | -80,32982 | -0,95983 | 223 |
| 276 | BJ3097 | BJN19-3 | Bejuco | Silvestre | Nido de ratón en coroso | 21/06/2007 | | X | X | X | M | -80,33058 | -0,9584 | 234 |
| 277 | MB3445 | BJN41-4 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla | 23/06/2007 | | X | X | X | H | -80,32982 | -0,95983 | 223 |
| 278 | MBN3446 | MBN29-2 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de pájaro | 23/07/2007 | X | X | | X | M | -80,35217 | -1,09085 | 280 |
| 279 | MB3447 | MBN10-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla | 23/07/2007 | | | | X | H | -80,35215 | -1,09257 | 265 |
| 280 | MBN3483 | MBN10-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla | 23/06/2007 | | | | X | H | -80,35215 | -1,09257 | 265 |

Anexo 9. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Manabí (continuación...).

| N | Código del Insectario- UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|------------------------------------|-----------------------|---------------|----------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------|-------------------|---------------|----------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 281 | MBN3487 | MBN43-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla en palmera | 23/06/2007 | X | X | X | X | M | -80,35293 | -1,09108 | 241 |
| 282 | MBN3488 | MBN58-2 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla | 23/06/2007 | X | X | X | X | M | -80,35203 | -1,09258 | 262 |
| 283 | MBN3489 | MBN40-3 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla | 23/06/2007 | | X | X | X | H | -80,35027 | -1,09304 | 332 |
| 284 | MBN3490 | MBN58-2 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla en palmera | 23/06/2007 | X | X | X | X | M | -80,35203 | -1,09258 | 262 |
| 285 | MBN3491 | MBN29-2 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de pájaro | 23/07/2007 | | X | | X | H | -80,35217 | -1,09085 | 280 |
| 286 | MBN3492 | MBN58-2 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla en palmera | 23/06/2007 | X | X | X | X | M | -80,35203 | -1,09258 | 262 |
| 287 | MBN3493 | MBN58-2 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla en palmera | 23/06/2007 | X | X | X | X | M | -80,35203 | -1,09258 | 262 |
| 288 | MBN3494 | MBN58-2 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla en palmera | 23/06/2007 | X | X | | X | M | -80,35203 | -1,09258 | 262 |
| 289 | MBN3506 | MBN36-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla en palmera | 23/06/2007 | X | X | X | X | M | -80,35224 | -1,09253 | 259 |
| 290 | MBN3507 | MBN36-1 | Maconta Abajo | Silvestre | Nido de ardilla en palmera | 23/06/2007 | X | X | X | X | M | -80,35224 | -1,09253 | 259 |
| 291 | ZP3022 | AP | Zapallo | Peridomiciliar | Nido de rata | 01/09/2006 | | | | X | H | -80,21398 | -1,01332 | 52 |

Anexo 9. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Manabí (continuación...).

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|--------------------------------|--------------------|---------------|----------------|------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|----------------|---------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 292 | ZP3023 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | Nido de rata | 01/09/2006 | | | | X | H | -80,21398 | -1,01332 | 52 |
| 295 | ZP3027 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | Nido de rata | 01/09/2006 | | | X | X | M | -80,21398 | -1,01332 | 52 |
| 296 | ZP3028 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | Nido de rata | 01/09/2006 | | X | X | X | H | -80,21398 | -1,01332 | 52 |
| 297 | ZP3029 | ZP | Zapallo | Peridomiciliar | Nido de rata | 01/09/2006 | | | | X | H | -80,21398 | -1,01332 | 52 |
| 298 | QM3524 | CA305 | Cruz Alta | Peridomiciliar | Nido de rata | 18/06/2007 | | | | X | H | -80,26073 | -1,00578 | 144 |
| 299 | CA3063 | CA305 | Cruz Alta | Peridomiciliar | Nido de rata | 18/06/2007 | | X | | X | H | -80,26073 | -1,00578 | 144 |
| 300 | CA3065 | CA306 | Cruz Alta | Peridomiciliar | Nido de rata en madera | 18/06/2007 | | | X | X | H | -80,25127 | -1,0055 | 135 |
| 301 | CA3067 | CA306 | Cruz Alta | Peridomiciliar | Nido de rata en madera | 18/06/2007 | | X | | X | M | -80,25127 | -1,0055 | 135 |
| 302 | MB2477 | MB215 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 23/07/2007 | | X | | X | H | -80,36863 | -1,08542 | 141 |
| 303 | MB2478 | MB215 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 23/07/2007 | | X | X | X | H | -80,36863 | -1,08542 | 141 |
| 304 | MB2479 | MB215 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 23/07/2007 | | | X | X | M | -80,36863 | -1,08542 | 141 |
| 305 | MB2480 | MB503 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 23/07/2007 | | X | X | X | H | -80,37815 | -1,08190 | 111 |
| 306 | MB2481 | MB503 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 23/07/2007 | X | X | | X | H | -80,37815 | -1,08190 | 111 |
| 307 | MB2482 | MB503 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Nido de rata en leña | 23/07/2007 | | X | X | X | H | -80,37815 | -1,08190 | 111 |

Anexo 9. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Manabí (continuación...).

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|--------------------------------|--------------------|---------------|----------------|----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|----------------|---------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 308 | BJ2485 | BJ326 | Bejuco | Domicilio | Entregado por señora | 25/06/2007 | | X | | X | H | -80,34727 | -0,9719 | 121 |
| 309 | MB2487 | MB107 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Entre leña | 23/07/2007 | | X | X | X | M | -80,40488 | -1.08767 | 71 |
| 310 | MB2488 | MB107 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Entre leña | 23/07/2007 | | X | X | X | M | -80,40488 | -1.08767 | 71 |
| 311 | BJ5952 | BJN19-5 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | | | X | H | -80,33058 | -0,95840 | 234 |
| 312 | BJ5953 | BJN19-5 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | X | | X | H | -80,33058 | -0,95840 | 234 |
| 313 | BJN3110 | BJN12-1 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | | X | X | M | -80,33049 | -0,95838 | 239 |
| 315 | BJ3761 | BJN12-1 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | X | X | X | M | -80,33049 | -0,95838 | 239 |
| 316 | BJ3762 | BJN12-1 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | | | X | M | -80,33049 | -0,95838 | 239 |
| 317 | BJ3763 | BJN12-1 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | X | | X | M | -80,33049 | -0,95838 | 239 |
| 318 | BJ3764 | BJN44-1 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | X | X | X | M | -80,33105 | -0,95900 | 247 |
| 319 | BJ3765 | BJN19-5 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | | X | X | H | -80,33058 | -0,95840 | 234 |
| 320 | BJ3766 | BJN27-2 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | X | X | X | X | H | -80,32989 | -0,96218 | 308 |
| 321 | BJ3767 | BJN27-2 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | X | X | X | H | -80,32989 | -0,96218 | 308 |
| 322 | BJ3768 | BJN41-4 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | X | | X | H | -80,32982 | -0,95983 | 223 |
| 323 | BJ3769 | BJN41-4 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | X | | X | H | -80,32982 | -0,95983 | 223 |
| 324 | BJ3770 | BJN41-4 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | | | X | H | -80,32982 | -0,95983 | 223 |
| 325 | BJ3771 | BJN44-1 | Bejuco | Silvestre | Nido de ardilla | 21/06/2007 | | X | X | X | H | -80,33105 | -0,95900 | 247 |

Anexo 9. Origen, código (laboratorio y vivienda), hábitat, sexo de los especímenes de *R. ecuadoriensis* analizados en este estudio de la provincia de Manabí (continuación).

| N | Código del Insectario-UEM-CIEI | Código de vivienda | Comunidad | Hábitat | Sitio de Captura | Fecha de colección | Análisis del Fenotipo | | Análisis del Genotipo | | Sexo (H/M) | Longitud (E/O) | Latitud (N/S) | Altitud (m.s.n.m) |
|-----|--------------------------------|--------------------|---------------|----------------|------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|------------|----------------|---------------|-------------------|
| | | | | | | | Fenotipo antenal | Morfometría geométrica de alas | mt Cyt b | Microsatélites (L13 y L47) | | | | |
| 326 | BJ4078 | BJ417 | Bejuco | Domicilio | dormitorio | 25/06/2007 | | X | X | X | H | -80,34806 | -0,98891 | 75 |
| 327 | BJ4079 | BJ417 | Bejuco | Domicilio | dormitorio | 25/06/2007 | | X | X | X | H | -80,34806 | -0,98891 | 75 |
| 328 | BJ4080 | BJ407 | Bejuco | Domicilio | Cama | 25/06/2007 | | | X | X | M | -80,34746 | -0,99167 | 92 |
| 329 | MB4081 | MB303 | Maconta Abajo | Domicilio | dormitorio | 23/07/2007 | | X | X | X | M | -80,37455 | -1,08269 | 125 |
| 330 | MB4098 | MB303 | Maconta Abajo | Domicilio | dormitorio | 23/07/2007 | | X | X | X | M | -80,37455 | -1,08269 | 125 |
| 331 | MB4099 | MB303 | Maconta Abajo | Domicilio | dormitorio | 23/07/2007 | | | X | X | M | -80,37455 | -1,08269 | 125 |
| 332 | MB4100 | MB303 | Maconta Abajo | Domicilio | dormitorio | 23/07/2007 | | X | | X | M | -80,37455 | -1,08269 | 125 |
| 333 | MB4106 | MBN6-2 | Maconta Abajo | Peridomiciliar | Palmera | 23/07/2007 | | | | X | M | -80,35293 | -1,09027 | 262 |
| 334 | BJ4114 | BJ406 | Bejuco | Domicilio | dormitorio | 08/02/2007 | | | | X | M | -80,34635 | -0,99175 | 75 |
| 335 | BJ4115 | BJ406 | Bejuco | Domicilio | dormitorio | 08/02/2007 | | X | | X | H | -80,34635 | -0,99175 | 75 |
| 336 | BJ4116 | BJ406 | Bejuco | Domicilio | dormitorio | 08/02/2007 | | X | | X | H | -80,34635 | -0,99175 | 75 |

Anexo 10. Resultados del análisis de Fenotipo antenal de los especímenes de *R. ecuadoriensis* utilizados en este estudio (continuación...).

| N | Código | Comunidad | Sexo | Región | Hábitat | Sitio de Captura | Pedicelo | Flagelo 1 | | | | Flagelo 2 | | | |
|----|---------|-----------------|------|--------|-----------|-------------------------------|----------|-----------|-----|-----|----|-----------|-----|-----|----|
| | | | | | | | BR | BR | TPF | TPG | BA | BR | TPF | TPG | BA |
| 1 | SSN3514 | Santa Rosa | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 78 | 22 | 25 | 57 | 11 | 9 | 18 | 49 | 7 |
| 2 | ND2713 | Naranjo Dulce | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 57 | 22 | 26 | 22 | 15 | 13 | 33 | 54 | 15 |
| 3 | CG3480 | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 60 | 26 | 17 | 79 | 10 | 12 | 30 | 69 | 20 |
| 4 | CG3482 | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 57 | 18 | 35 | 62 | 17 | 10 | 31 | 76 | 29 |
| 5 | CG3479 | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 58 | 22 | 32 | 53 | 15 | 14 | 34 | 65 | 14 |
| 6 | CG3481 | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 58 | 17 | 35 | 74 | 21 | 9 | 27 | 57 | 22 |
| 7 | ND3358 | Naranjo Dulce | M | Loja | Silvestre | Nido de ardilla en Chirimoyos | 55 | 14 | 16 | 26 | 5 | 8 | 14 | 53 | 5 |
| 8 | ND2712 | Naranjo Dulce | M | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 50 | 28 | 36 | 87 | 25 | 18 | 35 | 83 | 18 |
| 9 | SSN3511 | Santa Rosa | M | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 50 | 21 | 33 | 58 | 8 | 10 | 36 | 70 | 21 |
| 10 | SSN3513 | Santa Rosa | M | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 49 | 24 | 15 | 48 | 13 | 9 | 33 | 78 | 24 |
| 11 | GL422 | Galápagos | M | Loja | Silvestre | Nido de ardilla en palo | 55 | 25 | 33 | 63 | 19 | 13 | 40 | 73 | 17 |
| 12 | SSN3512 | Santa Rosa | M | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 50 | 20 | 37 | 50 | 20 | 8 | 40 | 64 | 23 |
| 13 | TR2813 | Tuburo | H | Loja | Domicilio | Dormitorio debajo del colchón | 59 | 27 | 23 | 41 | 16 | 12 | 29 | 66 | 28 |
| 14 | ND3509 | Naranjo Dulce | H | Loja | Domicilio | Cama | 43 | 25 | 25 | 43 | 13 | 15 | 24 | 68 | 15 |
| 15 | SS2689 | Santa Rosa | H | Loja | Domicilio | Pared debajo del papel | 54 | 15 | 39 | 50 | 18 | 12 | 48 | 70 | 25 |
| 16 | 6AH | Ashimingo | H | Loja | Domicilio | Intradomicilio | 63 | 23 | 21 | 46 | 5 | 10 | 29 | 60 | 10 |
| 17 | 48AH | Ashimingo | H | Loja | Domicilio | Intradomicilio | 52 | 25 | 25 | 32 | 7 | 14 | 26 | 47 | 14 |
| 18 | 96SS | Santa Rosa | H | Loja | Domicilio | Cama | 58 | 18 | 18 | 35 | 12 | 11 | 29 | 51 | 16 |
| 19 | VC3047 | Vega del Carmen | M | Loja | Domicilio | Dentro de la casa | 58 | 26 | 25 | 47 | 6 | 10 | 28 | 82 | 12 |
| 20 | EX3011 | La Extensa | M | Loja | Domicilio | Cuyera dentro de la casa | 72 | 35 | 55 | 101 | 30 | 14 | 44 | 91 | 26 |

Anexo 10. Resultados del análisis de Fenotipo antenal de los especímenes de *R. ecuadoriensis* utilizados en este estudio (continuación...).

| N | Código | Comunidad | Sexo | Región | Hábitat | Sitio de Captura | Pedicelo | Flagelo 1 | | | | Flagelo 2 | | | |
|----|---------|------------|------|--------|---------------|-------------------------|----------|-----------|-----|-----|----|-----------|-----|-----|----|
| | | | | | | | BR | BR | TPF | TPG | BA | BR | TPF | TPG | BA |
| 22 | GL2708 | Galápagos | M | Loja | Domicilio | cocina | 69 | 25 | 45 | 94 | 16 | 15 | 35 | 105 | 19 |
| 23 | AH2404 | Ashimingo | M | Loja | Domicilio | entregado por la señora | 65 | 25 | 38 | 60 | 18 | 15 | 42 | 89 | 18 |
| 24 | SS3468 | Santa Rosa | M | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 56 | 26 | 37 | 53 | 26 | 14 | 46 | 102 | 32 |
| 25 | SS3043 | Santa Rosa | M | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 56 | 20 | 46 | 76 | 13 | 10 | 51 | 80 | 26 |
| 26 | SS3465 | Santa Rosa | M | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 64 | 16 | 44 | 88 | 18 | 14 | 40 | 84 | 24 |
| 27 | SS3471 | Santa Rosa | M | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 55 | 28 | 35 | 54 | 23 | 11 | 44 | 89 | 25 |
| 28 | SS3476 | Santa Rosa | M | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 63 | 17 | 59 | 76 | 17 | 9 | 48 | 86 | 29 |
| 29 | SS3474 | Santa Rosa | H | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 59 | 22 | 47 | 84 | 25 | 10 | 57 | 91 | 29 |
| 30 | SS3475 | Santa Rosa | H | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 49 | 28 | 31 | 51 | 16 | 15 | 41 | 71 | 21 |
| 31 | SS3383 | Santa Rosa | H | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 56 | 22 | 27 | 67 | 11 | 9 | 36 | 80 | 15 |
| 32 | SS3473 | Santa Rosa | H | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 59 | 14 | 39 | 73 | 19 | 16 | 50 | 98 | 25 |
| 33 | SS3464 | Santa Rosa | H | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 64 | 25 | 53 | 82 | 19 | 18 | 53 | 80 | 30 |
| 34 | 4CG | La Ciénega | H | Loja | Peridomicilio | Nido de paloma | 48 | 24 | 43 | 69 | 14 | 15 | 48 | 85 | 30 |
| 35 | 5CG | La Ciénega | M | Loja | Peridomicilio | Nido de paloma | 57 | 15 | 44 | 75 | 20 | 16 | 48 | 80 | 35 |
| 36 | CG1381 | La Ciénega | H | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 54 | 22 | 40 | 67 | 22 | 11 | 54 | 112 | 28 |
| 37 | CG2401 | La Ciénega | H | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 60 | 20 | 51 | 74 | 18 | 16 | 54 | 102 | 26 |
| 38 | 55CG | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 61 | 24 | 48 | 80 | 23 | 17 | 52 | 87 | 28 |
| 39 | 56CG | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 53 | 24 | 56 | 71 | 20 | 18 | 44 | 68 | 26 |
| 40 | SSN3510 | Santa Rosa | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 53 | 21 | 38 | 39 | 7 | 14 | 52 | 82 | 19 |
| 41 | SSN3516 | Santa Rosa | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 58 | 20 | 40 | 80 | 15 | 13 | 50 | 83 | 19 |
| 42 | GL3424 | Galápagos | H | Loja | Silvestre | Nido de rata en flor | 65 | 20 | 45 | 86 | 20 | 8 | 57 | 95 | 17 |
| 43 | 151CG | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 50 | 24 | 37 | 53 | 7 | 11 | 42 | 98 | 25 |
| 44 | 152CG | La Ciénega | M | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 51 | 19 | 46 | 61 | 26 | 8 | 56 | 67 | 26 |

Anexo 10. Resultados del análisis de Fenotipo antenal de los especímenes de *R. ecuadoriensis* utilizados en este estudio (continuación...).

| N | Código | Comunidad | Sexo | Región | Hábitat | Sitio de Captura | Pedicelo | | Flagelo 1 | | | | Flagelo 2 | | |
|----|-----------|---------------|------|--------|---------------|----------------------------------|----------|----|-----------|-----|----|----|-----------|-----|----|
| | | | | | | | BR | BR | TPF | TPG | BA | BR | TPF | TPG | BA |
| 45 | 153CG | La Ciénega | M | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 61 | 19 | 54 | 69 | 17 | 8 | 48 | 80 | 23 |
| 46 | 155CG | La Ciénega | M | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 52 | 20 | 50 | 84 | 19 | 14 | 52 | 99 | 23 |
| 47 | CG2405 | La Ciénega | M | Loja | Silvestre | Llegó volando a la trampa de luz | 62 | 57 | 77 | 33 | 7 | 33 | 57 | 87 | 27 |
| 48 | 62CG | La Ciénega | H | Loja | Peridomicilio | Nido de paloma | 65 | 24 | 51 | 86 | 25 | 16 | 44 | 93 | 29 |
| 49 | 66CG | La Ciénega | H | Loja | Peridomicilio | Nido de paloma | 52 | 19 | 40 | 74 | 17 | 13 | 18 | 92 | 14 |
| 50 | 61CG | La Ciénega | M | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 54 | 28 | 30 | 58 | 15 | 13 | 40 | 90 | 31 |
| 51 | 54GL | Galápagos | M | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 63 | 17 | 50 | 85 | 20 | 15 | 32 | 87 | 20 |
| 52 | 135SS507 | Santa Rosa | M | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 64 | 26 | 44 | 57 | 10 | 14 | 36 | 108 | 26 |
| 53 | 136SS508 | Santa Rosa | M | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 61 | 26 | 48 | 93 | 17 | 17 | 43 | 97 | 31 |
| 54 | 138SS509 | Santa Rosa | M | Loja | Peridomicilio | Nido de gallina | 61 | 16 | 47 | 89 | 15 | 14 | 53 | 95 | 27 |
| 55 | 8AH | Ashimingo | M | Loja | Domicilio | Cama | 48 | 28 | 32 | 76 | 10 | 12 | 40 | 80 | 14 |
| 56 | 94SS | Santa Rosa | M | Loja | Domicilio | Cama | 60 | 18 | 20 | 55 | 8 | 18 | 37 | 61 | 29 |
| 57 | 95SS | Santa Rosa | M | Loja | Domicilio | Cama | 56 | 27 | 18 | 41 | 7 | 16 | 32 | 89 | 37 |
| 58 | 97EX401 | La Extensa | M | Loja | Domicilio | Cuyera dentro de la casa | 58 | 26 | 40 | 80 | 23 | 10 | 46 | 102 | 24 |
| 59 | 98EX401 | La Extensa | M | Loja | Domicilio | Cuyera dentro de la casa | 63 | 25 | 59 | 72 | 29 | 16 | 43 | 95 | 37 |
| 60 | MBN58-2 | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla | 55 | 25 | 38 | 36 | 12 | 13 | 30 | 72 | 25 |
| 61 | 28MBN36-4 | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de Ardilla | 90 | 22 | 37 | 88 | 16 | 11 | 38 | 83 | 21 |
| 62 | 29MBN36-4 | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de Ardilla | 73 | 20 | 47 | 85 | 21 | 13 | 40 | 72 | 22 |
| 63 | 30MBN36-4 | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de Ardilla | 73 | 17 | 45 | 86 | 19 | 9 | 49 | 72 | 25 |
| 64 | 31BJN27-2 | Bejuco | H | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla | 78 | 24 | 67 | 94 | 15 | 15 | 43 | 95 | 18 |
| 65 | 12MBN6-1 | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de ratón en palma de cade | 85 | 30 | 48 | 98 | 12 | 15 | 47 | 141 | 32 |
| 66 | 46BJN6 | Bejuco | H | Manabi | Silvestre | Nido de ratón en coroso | 82 | 26 | 74 | 134 | 33 | 15 | 53 | 159 | 30 |

Anexo 10. Resultados del análisis de Fenotipo antenal de los especímenes de *R. ecuadoriensis* utilizados en este estudio (continuación...).

| N | Código | Comunidad | Sexo | Región | Hábitat | Sitio de Captura | Pedicelo | Flagelo 1 | | | | Flagelo 2 | | | |
|----|------------|---------------|------|--------|---------------|------------------------------|----------|-----------|-----|-----|----|-----------|-----|-----|----|
| | | | | | | | BR | BR | TPF | TPG | BA | BR | TPF | TPG | BA |
| 67 | 141MB | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de rata en palmera | 95 | 36 | 75 | 184 | 40 | 13 | 45 | 139 | 40 |
| 68 | 142MB | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de rata en palmera | 86 | 28 | 68 | 135 | 20 | 16 | 48 | 116 | 31 |
| 69 | 144MB | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de rata en palmera | 83 | 26 | 58 | 159 | 34 | 14 | 36 | 170 | 26 |
| 70 | MBN3492 | Maconta Abajo | M | Manabi | Silvestre | Nido de raton en palmera | 85 | 26 | 70 | 126 | 23 | 16 | 54 | 120 | 18 |
| 71 | MBN3490 | Maconta Abajo | M | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla | 87 | 30 | 63 | 97 | 19 | 15 | 41 | 106 | 11 |
| 72 | MBN3493 | Maconta Abajo | M | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla | 83 | 26 | 67 | 87 | 16 | 16 | 53 | 102 | 21 |
| 73 | MBN3494 | Maconta Abajo | M | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla | 67 | 27 | 79 | 129 | 33 | 10 | 57 | 109 | 29 |
| 74 | MBN3506 | Maconta Abajo | M | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla | 81 | 24 | 62 | 115 | 24 | 13 | 59 | 118 | 23 |
| 75 | MBN3507 | Maconta Abajo | M | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla | 75 | 26 | 53 | 100 | 28 | 16 | 59 | 136 | 34 |
| 76 | MBN3446 | Maconta Abajo | M | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla | 84 | 27 | 37 | 63 | 25 | 8 | 53 | 88 | 27 |
| 77 | MBN3487 | Maconta Abajo | M | Manabi | Silvestre | Nido de pájaro | 82 | 26 | 52 | 125 | 20 | 17 | 42 | 110 | 30 |
| 78 | MBN3449 | Maconta Abajo | M | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla en rama seca | 81 | 25 | 68 | 120 | 36 | 15 | 37 | 102 | 41 |
| 79 | 150BJN55-1 | Bejuco | M | Manabi | Silvestre | Nido de rata en palmera | 87 | 28 | 59 | 156 | 37 | 15 | 54 | 177 | 37 |
| 80 | 36JM 108 | Jesus Maria | H | Manabi | Peridomicilio | Nido de rata en leña | 66 | 16 | 30 | 46 | 12 | 9 | 42 | 56 | 32 |
| 81 | 37JM 108 | Jesus Maria | H | Manabi | Peridomicilio | Nido de rata en leña | 83 | 19 | 36 | 66 | 10 | 9 | 46 | 78 | 26 |
| 82 | 15BJ | Bejuco | H | Manabi | Peridomicilio | Nido de rata en pinuela | 74 | 18 | 51 | 100 | 12 | 14 | 38 | 82 | 16 |
| 83 | 3MB216 | Maconta Abajo | H | Manabi | Peridomicilio | Nido de Gallina | 77 | 29 | 26 | 50 | 11 | 14 | 28 | 84 | 17 |
| 84 | 40JM301 | Jesus Maria | H | Manabi | Peridomicilio | Nido de gallina | 72 | 18 | 48 | 91 | 24 | 12 | 41 | 94 | 24 |
| 85 | 11MB | Maconta Abajo | H | Manabi | Peridomicilio | Piñuela nido de rata | 85 | 32 | 78 | 155 | 35 | 11 | 51 | 149 | 35 |

Anexo 10. Resultados del análisis de Fenotipo antenal de los especímenes de *R. ecuadoriensis* utilizados en este estudio (continuación).

| N | Código | Comunidad | Sexo | Región | Hábitat | Sitio de Captura | Pedicelo | Flagelo 1 | | | | Flagelo 2 | | | |
|----|----------|---------------|------|--------|---------------|------------------------|----------|-----------|-----|-----|----|-----------|-----|-----|----|
| | | | | | | | BR | BR | TPF | TPG | BA | BR | TPF | TPG | BA |
| 86 | 19MB | Maconta Abajo | H | Manabi | Peridomicilio | Piñuela nido de rata | 87 | 27 | 77 | 114 | 24 | 12 | 64 | 122 | 27 |
| 87 | 21ZP | Zapallo | H | Manabi | Peridomicilio | Piñuela nido de rata | 86 | 23 | 81 | 136 | 20 | 16 | 50 | 109 | 30 |
| 88 | 22ZP | Zapallo | H | Manabi | Peridomicilio | Piñuela nido de rata | 77 | 30 | 46 | 99 | 13 | 14 | 43 | 125 | 22 |
| 89 | 32CA315 | Cruz Alta | H | Manabi | Peridomicilio | En leña | 95 | 17 | 83 | 138 | 33 | 9 | 45 | 117 | 20 |
| 90 | 17ZP | Zapallo | M | Manabi | Peridomicilio | Piñuela nido de rata | 73 | 29 | 44 | 76 | 5 | 16 | 60 | 122 | 21 |
| 91 | 18ZP | Zapallo | M | Manabi | Peridomicilio | Piñuela nido de rata | 72 | 29 | 62 | 121 | 29 | 15 | 57 | 122 | 31 |
| 92 | 20ZP | Zapallo | M | Manabi | Peridomicilio | Piñuela nido de rata | 71 | 23 | 74 | 110 | 17 | 17 | 62 | 171 | 35 |
| 93 | 23ZP | Zapallo | M | Manabi | Peridomicilio | Piñuela nido de rata | 69 | 25 | 53 | 70 | 11 | 16 | 44 | 94 | 22 |
| 94 | 27MB | Maconta Abajo | M | Manabi | Peridomicilio | Acumulacion de maderas | 80 | 25 | 63 | 86 | 34 | 15 | 53 | 84 | 34 |
| 95 | 39JM301 | Jesus Maria | M | Manabi | Peridomicilio | Nido de gallina | 90 | 31 | 69 | 148 | 25 | 16 | 56 | 173 | 30 |
| 96 | 45JM301 | Jesus Maria | M | Manabi | Peridomicilio | Nido de Gallina | 100 | 28 | 73 | 164 | 27 | 16 | 46 | 158 | 30 |
| 97 | 145BJ203 | Bejuco | M | Manabi | Peridomicilio | Nido de rata en leña | 84 | 15 | 67 | 141 | 21 | 15 | 46 | 135 | 32 |
| 98 | 146BJ203 | Bejuco | M | Manabi | Peridomicilio | Nido de rata en leña | 88 | 39 | 54 | 78 | 11 | 16 | 39 | 137 | 33 |
| 99 | 148BJ203 | Bejuco | M | Manabi | Peridomicilio | Nido de rata en leña | 73 | 32 | 103 | 128 | 29 | 15 | 66 | 130 | 38 |

Anexo 11. Resultados del análisis de Fenotipo antenal de los especímenes del “complejo *pallenscens*” (*R. colombiensis*, *R. pallenscens* y *R. ecuadoriensis* de Loja y Manabí que se utilizaron en este estudio (continuación...)).

| N | Código | Comunidad | Sexo | Región | Hábitat | Sitio de Captura | Pedicelo | | Flagelo 1 | | | | Flagelo 2 | | |
|----|-----------|---------------|------|--------|-----------|--------------------------------|----------|----|-----------|-----|----|----|-----------|-----|----|
| | | | | | | | BR | BR | TPF | TPG | BA | BR | TPF | TPG | BA |
| 1 | SSN3514 | Santa Rosa | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 78 | 22 | 25 | 57 | 11 | 9 | 18 | 49 | 7 |
| 2 | ND2713 | Naranjo Dulce | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 57 | 22 | 26 | 22 | 15 | 13 | 33 | 54 | 15 |
| 3 | CG3480 | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 60 | 26 | 17 | 79 | 10 | 12 | 30 | 69 | 20 |
| 4 | CG3482 | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 57 | 18 | 35 | 62 | 17 | 10 | 31 | 76 | 29 |
| 5 | CG3479 | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 58 | 22 | 32 | 53 | 15 | 14 | 34 | 65 | 14 |
| 6 | CG3481 | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 58 | 17 | 35 | 74 | 21 | 9 | 27 | 57 | 22 |
| 7 | 55CG | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 61 | 24 | 48 | 80 | 23 | 17 | 52 | 87 | 28 |
| 8 | 56CG | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 53 | 24 | 56 | 71 | 20 | 18 | 44 | 68 | 26 |
| 9 | SSN3510 | Santa Rosa | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 53 | 21 | 38 | 39 | 7 | 14 | 52 | 82 | 19 |
| 10 | SSN3516 | Santa Rosa | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 58 | 20 | 40 | 80 | 15 | 13 | 50 | 83 | 19 |
| 11 | GL3424 | Galápagos | H | Loja | Silvestre | Nido de rata en flor | 65 | 20 | 45 | 86 | 20 | 8 | 57 | 95 | 17 |
| 12 | 151CG | La Ciénega | H | Loja | Silvestre | Nido de ardilla | 50 | 24 | 37 | 53 | 7 | 11 | 42 | 98 | 25 |
| 13 | MBN58-2 | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla | 55 | 25 | 38 | 36 | 12 | 13 | 30 | 72 | 25 |
| 14 | 28MBN36-4 | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de Ardilla | 90 | 22 | 37 | 88 | 16 | 11 | 38 | 83 | 21 |
| 15 | 29MBN36-4 | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de Ardilla | 73 | 20 | 47 | 85 | 21 | 13 | 40 | 72 | 22 |
| 16 | 30MBN36-4 | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de Ardilla | 73 | 17 | 45 | 86 | 19 | 9 | 49 | 72 | 25 |
| 17 | 31BJN27-2 | Bejuco | H | Manabi | Silvestre | Nido de ardilla | 78 | 24 | 67 | 94 | 15 | 15 | 43 | 95 | 18 |
| 18 | 12MBN6-1 | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de ratón en palma de cade | 85 | 30 | 48 | 98 | 12 | 15 | 47 | 141 | 32 |
| 19 | 46BJN6 | Bejuco | H | Manabi | Silvestre | Nido de ratón en coroso | 82 | 26 | 74 | 134 | 33 | 15 | 53 | 159 | 30 |
| 20 | 141MB | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de rata en palmera | 95 | 36 | 75 | 184 | 40 | 13 | 45 | 139 | 40 |

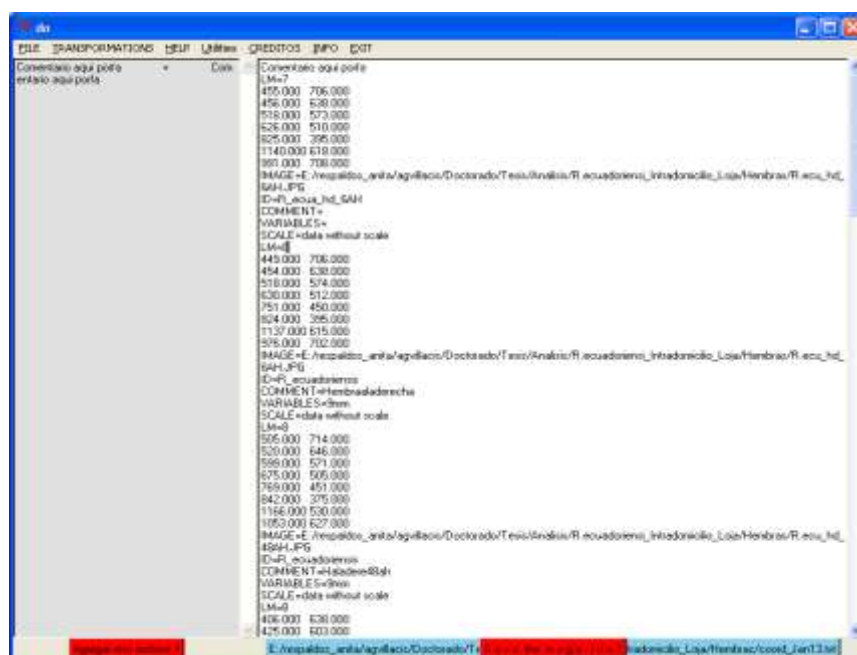
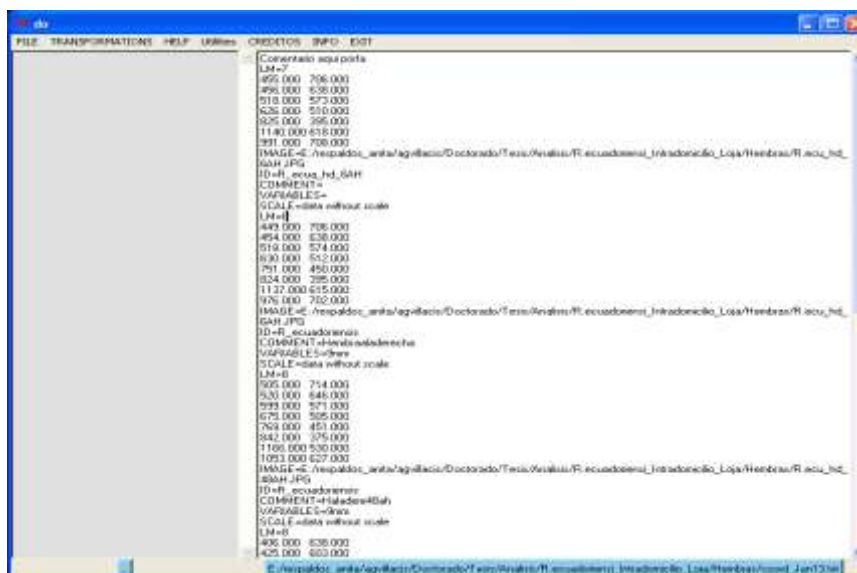
Anexo 11. Resultados del análisis de Fenotipo antenal de los especímenes del “complejo *pallescens*” (*R. colombiensis*, *R. pallescens* y *R. ecuadoriensis* de Loja y Manabí que se utilizaron en este estudio (continuación).

| N | Código | Comunidad | Sexo | Región | Hábitat | Sitio de Captura | Pedicelo | Flagelo 1 | | | | Flagelo 2 | | | |
|----|--------|-----------------------|------|--------|-----------|-------------------------|----------|-----------|-----|-----|----|-----------|-----|-----|----|
| | | | | | | | BR | BR | TPF | TPG | BA | BR | TPF | TPG | BA |
| 22 | 144MB | Maconta Abajo | H | Manabi | Silvestre | Nido de rata en palmera | 83 | 26 | 58 | 159 | 34 | 14 | 36 | 170 | 26 |
| 23 | 926 | Tolima/Colombia | H | Tolima | Silvestre | palma | 121 | 38 | 129 | 189 | 52 | 13 | 95 | 134 | 40 |
| 24 | 1934 | Tolima/Colombia | H | Tolima | Silvestre | palma | 103 | 41 | 71 | 164 | 35 | 16 | 72 | 131 | 29 |
| 25 | 1935 | Tolima/Colombia | H | Tolima | Silvestre | palma | 104 | 38 | 105 | 220 | 36 | 16 | 68 | 173 | 35 |
| 26 | 1936 | Tolima/Colombia | H | Tolima | Silvestre | palma | 98 | 39 | 93 | 187 | 58 | 13 | 60 | 173 | 38 |
| 27 | 1942 | Tolima/Colombia | H | Tolima | Silvestre | palma | 80 | 31 | 112 | 188 | 31 | 10 | 65 | 128 | 39 |
| 28 | 1943 | Tolima/Colombia | H | Tolima | Silvestre | palma | 100 | 37 | 93 | 207 | 38 | 17 | 61 | 173 | 30 |
| 29 | 1126 | Acondí/Chaco/Colombia | H | Chaco | Silvestre | palma | 97 | 35 | 70 | 134 | 39 | 18 | 70 | 167 | 33 |
| 30 | 1130 | Acondí/Chaco/Colombia | H | Chaco | Silvestre | palma | 106 | 32 | 92 | 168 | 45 | 15 | 54 | 172 | 54 |
| 31 | 1134 | Acondí/Chaco/Colombia | H | Chaco | Silvestre | palma | 98 | 35 | 85 | 184 | 32 | 15 | 72 | 167 | 46 |
| 32 | 2011 | Acondí/Chaco/Colombia | H | Chaco | Silvestre | palma | 98 | 38 | 72 | 169 | 46 | 19 | 55 | 192 | 52 |
| 33 | 2013 | Acondí/Chaco/Colombia | H | Chaco | Silvestre | palma | 107 | 28 | 97 | 186 | 43 | 16 | 76 | 194 | 61 |

Anexo 12. Programa COOw permite ordenar la información y coleccionar los puntos de referencia o landmarks de las alas de Triatominos para estudios de morfometría.



Anexo 13: El programa TETwin permite concatenar los datos, y verificar la información para comenzar los análisis de morfometría geométrica alar de Triatominos.



Anexo 15. Protocolo de extracción de ADN con el kit DNAeasy (Quiagen, 2006).

1. Para la extracción del ADN de triatominos se utilizaron las patas de individuos colectados de las provincias de Loja y Manabí.
2. Las muestras fueron previamente conservadas en alcohol al 100% por lo que se procedió a quitar el exceso de alcohol con papel absorbente antes de la extracción.
3. El tejido fue triturado con un bisturí estéril y macerado a través de un pistilo previamente autoclavado.
4. Aproximadamente un 25 mg de tejido fueron colocados en un tubo eppendorf de 1.5 ml. A este se le adicionó 180 µl de buffer ATL y 20 µl de Proteinasa K para lisar el tejido, posteriormente a esto se realizó una agitación (vortex) para mezclar el contenido.
5. Las muestras fueron colocadas en baño maría (56 °C) durante toda la noche como parte del proceso de lisis.
6. Una vez completado el tiempo de incubación se realizó otra agitación a las muestras por 15 segundos, se añadió 200 µl de Buffer AL seguido de una agitación (vortex).
7. Posteriormente, se adicionó 200 µl de etanol al 100% para precipitar el ADN, acompañado de una agitación (vortex) para mezclar el contenido.

8. Se pipeteó el contenido del eppendorf a la columna DNeasy mini spin introducida en tubo de colección de 2 ml. Se centrifugó la muestra a 8000 rpm (por un minuto) y se descartó el sobrenadante.
9. En un nuevo tubo de colección se colocó la columna y se agregó 500 µl de Buffer AW1. La muestra fue centrifugada por un minuto a 8000 rpm y el sobrenadante fue descartado.
10. La columna fue colocada en un nuevo tubo de colección, al que se agregaron 500 µl del buffer AW2 y se centrifugó a 14 000 rpm por tres minutos, el sobrenadante fue una vez más descartado.
11. Se colocó la columna un eppendorf autoclavado de 1.5 ml, a la que se le agregó 200 µl de Buffer AE a la membrana de la columna. Esta fue incubada a temperatura ambiente por un minuto y se procedió a centrifugar cada muestra por un minuto a 8000 rpm. Este último paso se realizó dos veces para obtener la mayor cantidad de ADN.
12. El ADN fue almacenado a 4 °C (Qiagen, 2006).

Anexo 16. Procedimiento de purificación Millipore Multiscreen HTS

Este procedimiento es utilizado para la limpieza de productos de PCR para el uso en reacciones de secuencia en secuenciador automático.

Materiales:

- Producto de PCR- Se recomienda un volumen de 20-100 ul
- Millipore MultiScreen HTS plate
- Colector de vacío millipore (uno más grande con una parrilla amplia)

Procedimiento:

1. Coloque la placa en el colector: Enganchar el colector hasta el grado del vacío
2. Añadir la muestra de PCR a un pozo sin utilizar. (señalar claramente los pozos que se ha utilizado anteriormente, no se debe utilizar los pozos ya usados previamente).
3. Encender el vacío en el banco y luego encienda el vacío en la línea del colector. Aspirar hasta que este(n) bien seco(s) y luego adicionar 30 segundos. Detener el aspirado en la línea del colector.
4. Añadir 100 ul de nucleasa- libre de agua a la muestra para lavarla. Encender el vacío hasta que quede totalmente seco por 30 segundos adicionales.
5. Remover la placa del colector y secar el fondo de la placa con papel toalla para remover el exceso de líquido.
6. Añadir el volumen inicial del buffer Tris-HCl y agitar bien en el agitador de placa en Room 5 por 10 minutos entre 160 y 180
7. Transferir el líquido desde la placa hasta un tubo de almacenamiento etiquetado.

Anexo 17. Protocolo a seguir para el proceso del ciclo de secuenciación o cycle sequencing

Este procedimiento es usado para preparar reacciones de secuencias mediante el secuenciador automático. Este protocolo ha sido optimizado para su uso en la máquina ABI 3130. Consulte por información adicional o cualquier conveniente a ABI Sequencing Chemistry Guide

Materiales:

Producto de PCR purificado

Big DYE terminator Ready Reaction Kit v1.1

ABI 5X o CDC 5X buffer de secuenciación (4 degree 3-door o -20 in hall)

Procedimiento:

1. Se realizará dos reacciones por muestra purificada, una con el primer forward y otra con el reverse. Por lo tanto, se crea dos master mix, uno con el forward primer y otro con el reverse. Realizar la mezcla por el número de reacciones que se está haciendo +1 para tener algo extra. Lo siguiente es por reacción por lo tanto se multiplica por el número total o reacciones. El volumen total será 10 ul así que después se decidirá la cantidad de ADN a añadir, agregar agua para hacer 10 ul. Con el 3100, usualmente 1-2 ul de ADN es suficiente.

0.5 ul Terminator Ready Reaction Mix v1.1

2.0 ul ABI o CDC Sequencing Buffer [5X] dependiendo con cual se va a trabajar)

1.0 ul Primer [5 pM]

1.0-2.0 ul ADN templado

-ul agua ultra pura

2. Colocar la cantidad correcta del master mix en tubos de pre-marcados

3. Añadir la cantidad de ADN a cada tubo de modo que el volumen final sea 10 ul.

4. El programa estándar es el siguiente: 25 ciclos de amplificación a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 1 minuto y un paso de extensión final a 4°C indefinido

Anexo 18. Protocolo a seguir en el proceso de purificación Centri-SEP

1.0 Columna de hidratación

- 1.1 Suavemente tapar la columna para asegurarse que el gel seco se ha situado en el fondo de la columna de giro (spin).
- 1.2 Remover la tapa de la columna superior y reconstituir la columna adicionando 0.80 ml de agua de grado reactivo o buffer. Dejar el tapón del final de la columna de tal forma que la columna pueda pararse por sí misma. Reemplazar la tapa de la columna e hidratar el gel agitando e invirtiendo la columna o utilizando el vortex brevemente. Esto es importante para hidratar a todas las de gel seco.
- 1.3 Permitir al menos 30 minutos de tiempo de hidratación a temperatura ambiente antes de utilizar las columnas. Las columnas reconstituidas pueden ser almacenadas en refrigeración al 4°C por varios días. En almacenamientos más prolongados puede ser realizado en 10 mM de azida de sodio (NaN₃). **Permitir que las columnas refrigeradas se calienten a temperatura ambiente antes de continuar el procedimiento.**

2.0 Eliminación del líquido intersticial

- 2.1 Eliminar las burbujas de aire de la columna de gel invirtiendo la columna y agitándola, tapando la columna, permitiendo que el gel se mezcle al final opuesto, mantener levantada la columna para permitir que el gel se asiente cuando corra en el microtubo.
- 2.2 Despees de que el gel se halla asentado y esté libre de burbujas, primero remueva la tapa de la columna y luego remueva el tapón del final de la columna del fondo.
- 2.3 Permita que el exceso del fluido de las columnas drenen dentro del tubo de lavado (2 ml). Si el líquido no empieza a fluir inmediatamente a travez del final de la columna, use una pera de pipeta de latex de 2 ml para aplicar suavemente presión de aire hacia la superficie superior de la columna para permitir que el liquido empiece a filtrar a través de la columna. La columna detendrá el drenado por si sola. Aproximadamente 200-250 ul se drenaran de la columna. **Descartar este líquido.**
- 2.4 Gire la columna y el tubo de lavado a una velocidad variable en la centrífuga de 750 X g por dos minutos para remover el líquido intersticial. Por ejemplo, utilice la microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C en 750 X g (rotor de 7,3 cm), la velocidad correcta es de 3,000 rpms. Si usted usa una microcentrífuga es

importante mantener la pista de la posición de la columna usando la marca de orientación en la columna.

- 2.5** Aproximadamente 300 ul de líquido será eliminado. Si existe una gota al final de la columna searla. Descarte el tubo de lavado y el líquido intersticial. **No permita que el material del gel se seque excesivamente. Procese la muestra dentro de los siguientes minutos.**

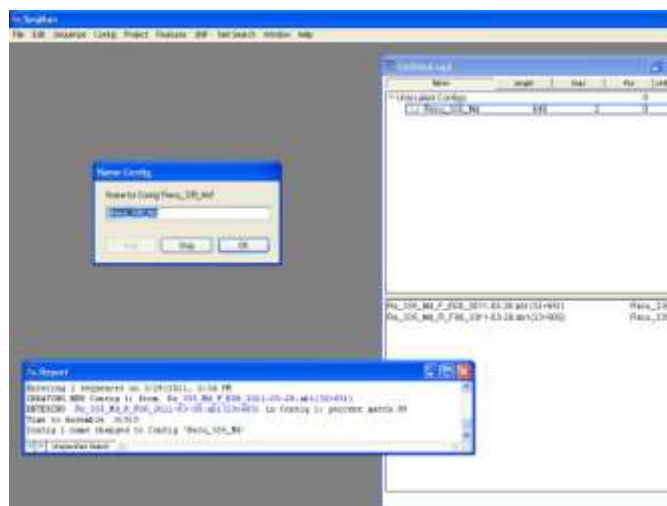
3.0 Procesamiento de la mezcla

- 3.1** Lleve la columna hacia la luz. Transfiera 20 ul de DyeDeoxyTM terminator reaction mixture hacia la superficie del gel. Cuidadosamente dispense la muestra directamente sobre el centro del gel hacia la superficie de la columna sin dañar la superficie del gel (vea figura 1). NO permita el contacto de los lados de la columna con la mezcla de la reacción o la punta de la pipeta de la muestra, esto puede reducir la eficacia de purificación y posiblemente arruinar el análisis por exceso de colorante.
- 3.2** Coloque la columna en EL TUBO DE COLECCIÓN DE LA MUESTRA (1,5 ml) y coloque los dos dentro del rotor. **Mantenga la orientación apropiada de la columna.** El punto más alto del gel en la columna debería siempre apuntar hacia afuera del rotor . Rotar la columna y el tubo de colección a **750 X g por dos minutos**. La muestra purificada será colectada en el fondo del tubo de la muestra de colección. Descarte la columna y proceda con el procedimiento de preparación de la muestra ABI.

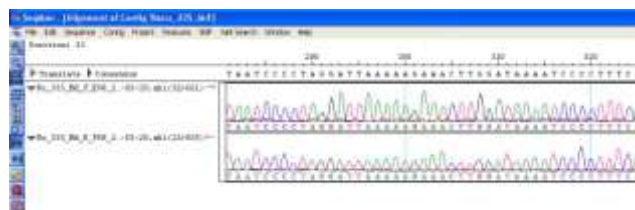
- 3.3** Seque la muestra en una centrífuga Vacuum. No aplique calor.

*DyeDeoxyTM, PrismTM, y Amplitaq^R

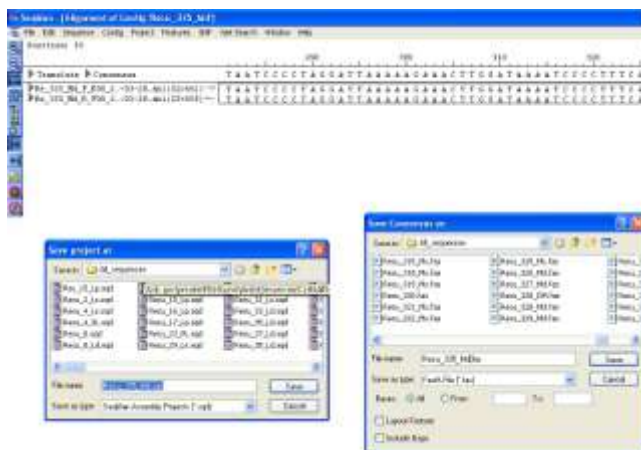
Anexo 19.- Programa SeqMan permite ensamblar y alinear las secuencias (Forward y Reverse) para análisis de gen mitocondrial (mt Cyt b). A. Ingreso de información para el ensamblaje. B y C. Alineación de las secuencias (F) y (R)



A.

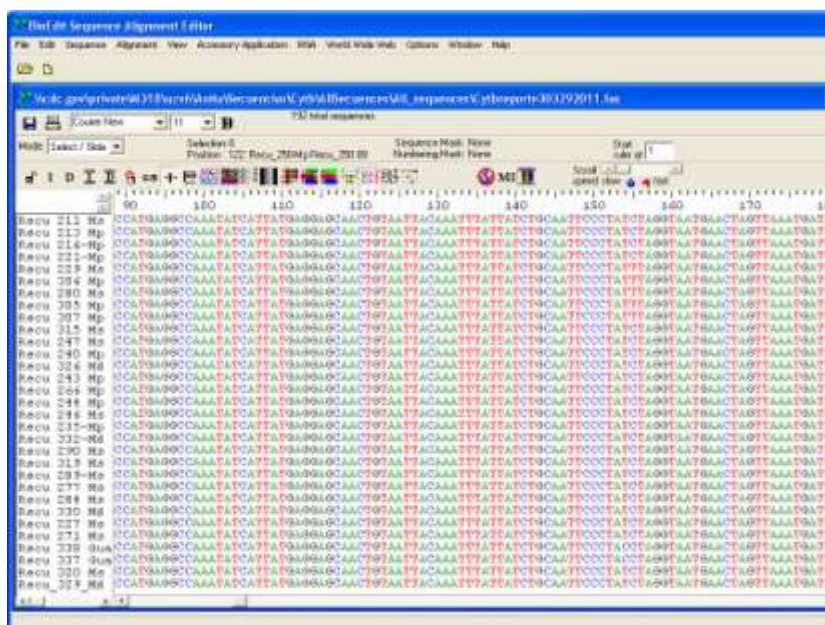


B.

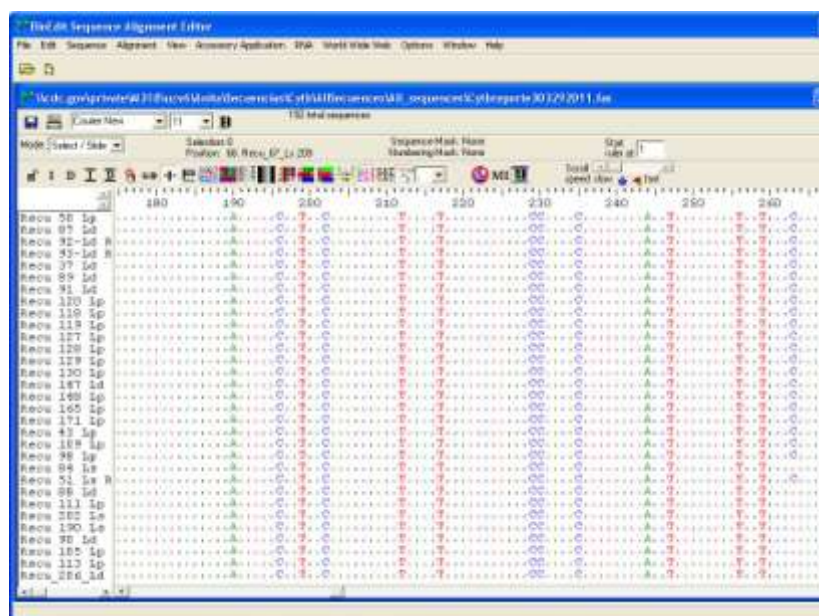


C.

Anexo 20. Programa Bioedit que permite alinear las secuencias obtenidas para el análisis de gen mitocondrial (mt Cyt b). A. Alineación de las secuencias obtenidas. B. Observación de los cambios de Bases [Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T)].



A.



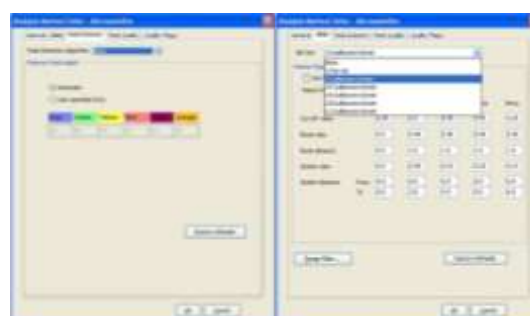
B.

Anexo 21. Programa GeneMapper permite la genotipificación y provee el tamaño y alelos del fragmento de ADN que se desea determinar en cada espécimen. A. Ingreso de información. **B.** Observación de la Información obtenida después de utilizar la lectura en el Secuenciador. **C.** Se escoge el fluorocromo de cada uno de los locus de *R. pallescens*.



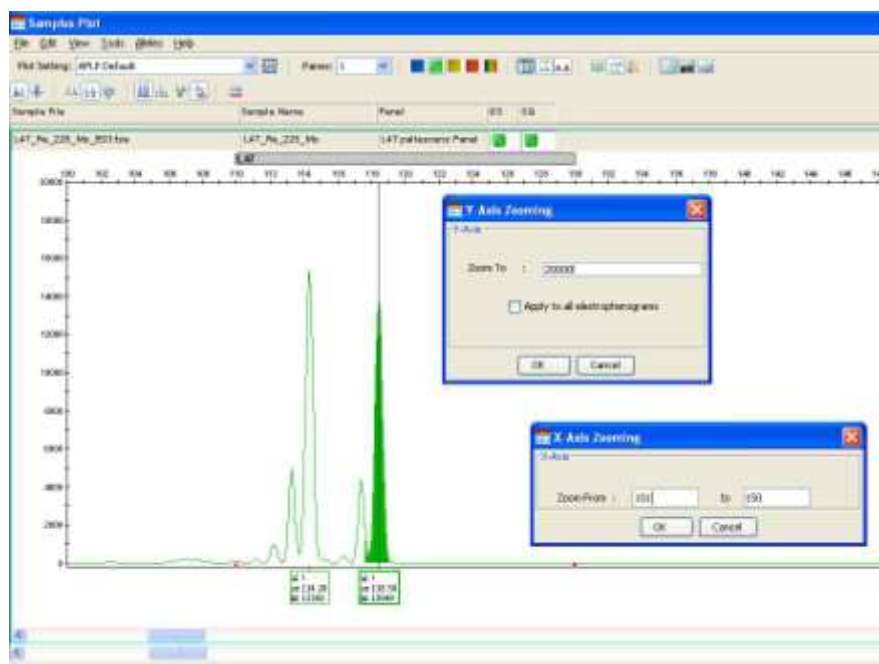
A.

B.



C.

Anexo 22. Programa GeneMapper permite la genotipificación y provee el tamaño y alelos del fragmento de ADN (pares de base) que se desea determinar en cada espécimen. Se observa picos claros mostrándonos el tamaño de los alelos (individuo heterocigoto).



Anexo 23. Tamaño del fragmento en pares de bases (pb) de los alelos obtenidos en los dos microstélites polimórficos para *R. ecuadoriensis* de Manabí y Loja.

| N | Provincia | Códigos | Hábitat | L13 | | L47 | |
|----|-----------|---------|------------|-----|-----|-----|-----|
| 1 | Loja | ND2704 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 2 | Loja | ND3509 | Domiciliar | 0 | 0 | 118 | 118 |
| 3 | Loja | SS2967 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 4 | Loja | SS2689 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 5 | Loja | ST2972 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 6 | Loja | ST2973 | Domiciliar | 0 | 0 | 114 | 118 |
| 7 | Loja | AH2404 | Domiciliar | 0 | 0 | 118 | 118 |
| 8 | Loja | VC3047 | Domiciliar | 164 | 164 | 116 | 116 |
| 9 | Loja | LM2456 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 10 | Loja | LM2457 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 11 | Loja | TR2813 | Domiciliar | 172 | 172 | 118 | 118 |
| 12 | Loja | CG2964 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 13 | Loja | GL2705 | Domiciliar | 162 | 164 | 114 | 118 |
| 14 | Loja | GL2706 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 15 | Loja | GL2707 | Domiciliar | 0 | 0 | 118 | 118 |
| 16 | Loja | GL2708 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 17 | Loja | GL2971 | Domiciliar | 166 | 166 | 116 | 118 |
| 18 | Loja | EX2399 | Domiciliar | 162 | 166 | 116 | 118 |
| 19 | Loja | EX3011 | Domiciliar | 160 | 160 | 116 | 118 |
| 20 | Loja | EX3012 | Domiciliar | 166 | 166 | 118 | 118 |
| 21 | Loja | AH5006 | Domiciliar | 160 | 172 | 116 | 118 |
| 22 | Loja | AH5007 | Domiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 23 | Loja | AH5008 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 24 | Loja | AH5009 | Domiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 25 | Loja | AH5010 | Domiciliar | 162 | 166 | 118 | 118 |
| 26 | Loja | AH5047 | Domiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 27 | Loja | AH5048 | Domiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 28 | Loja | SS5094 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |

| | | | | | | | |
|----|--------|--------|----------------|-----|-----|-----|-----|
| 29 | Loja | SS5095 | Domiciliar | 160 | 172 | 118 | 118 |
| 30 | Loja | SS5096 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 31 | Loja | SS5097 | Domiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 32 | Loja | EX5098 | Domiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 33 | Loja | EX5099 | Domiciliar | 160 | 164 | 116 | 118 |
| 34 | Loja | EX5100 | Domiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 35 | Loja | EX5101 | Domiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 36 | Loja | EX5139 | Domiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 37 | Loja | EX5140 | Domiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 38 | Loja | GL1385 | Domiciliar | 0 | 0 | 118 | 118 |
| 39 | Loja | TR1426 | Domiciliar | 160 | 160 | 118 | 118 |
| 40 | Loja | TR1427 | Domiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 41 | Loja | TR1428 | Domiciliar | 160 | 160 | 116 | 118 |
| 42 | Loja | BR1727 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 43 | Loja | BR1728 | Domiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 44 | Manabi | BJ2485 | Domicilio | 162 | 162 | 110 | 114 |
| 45 | Manabi | BJ4078 | Entregado | 166 | 168 | 112 | 118 |
| 46 | Manabi | BJ4079 | Entregado | 164 | 166 | 114 | 114 |
| 47 | Manabi | BJ4080 | Domicilio | 172 | 172 | 118 | 118 |
| 48 | Manabi | MB4081 | Entregado | 162 | 162 | 114 | 114 |
| 49 | Manabi | MB4098 | Entregado | 168 | 168 | 114 | 114 |
| 50 | Manabi | MB4099 | Entregado | 166 | 174 | 118 | 118 |
| 51 | Manabi | MB4100 | Entregado | 162 | 162 | 114 | 114 |
| 52 | Manabi | BJ4114 | Entregado | 160 | 166 | 112 | 114 |
| 53 | Manabi | BJ4115 | Entregado | 160 | 160 | 112 | 114 |
| 54 | Manabi | BJ4116 | Entregado | 164 | 164 | 114 | 118 |
| 55 | Guayas | SA6490 | Domicilio | 162 | 174 | 118 | 118 |
| 56 | Loja | SS3038 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 57 | Loja | SS3039 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 58 | Loja | SS3040 | Peridomiciliar | 172 | 172 | 118 | 118 |
| 59 | Loja | SS3041 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 116 |
| 60 | Loja | SS3042 | Peridomiciliar | 172 | 172 | 118 | 118 |

| | | | | | | | |
|----|------|--------|----------------|-----|-----|-----|-----|
| 61 | Loja | SS3043 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 0 | 0 |
| 62 | Loja | SS3464 | Peridomiciliar | 172 | 172 | 118 | 118 |
| 63 | Loja | SS346 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 64 | Loja | SS3468 | Peridomiciliar | 160 | 160 | 118 | 118 |
| 65 | Loja | SS3470 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 66 | Loja | SS3471 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 67 | Loja | SS3474 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 68 | Loja | SS3475 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 69 | Loja | SS3476 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 70 | Loja | SS3477 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 71 | Loja | SS3478 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 116 |
| 72 | Loja | CG2319 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 114 | 114 |
| 73 | Loja | CG2320 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 74 | Loja | CG2332 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 75 | Loja | CG2333 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 76 | Loja | CG2334 | Peridomiciliar | 162 | 172 | 118 | 118 |
| 77 | Loja | CG2335 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 0 | 0 |
| 78 | Loja | CG2336 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 79 | Loja | CG2337 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 80 | Loja | CG2338 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 81 | Loja | CG2339 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 82 | Loja | CG2401 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 83 | Loja | CG2406 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 84 | Loja | CG2818 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 0 | 0 |
| 85 | Loja | EX2814 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 86 | Loja | EX2815 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 87 | Loja | EX2816 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 88 | Loja | EX2817 | Peridomiciliar | 162 | 174 | 118 | 118 |
| 89 | Loja | CG5004 | Peridomiciliar | 172 | 172 | 116 | 118 |
| 90 | Loja | CG5005 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 91 | Loja | AB5049 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 92 | Loja | AB5050 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |

| | | | | | | | |
|-----|------|--------|----------------|-----|-----|-----|-----|
| 93 | Loja | GL5051 | Peridomiciliar | 160 | 160 | 118 | 118 |
| 94 | Loja | GL5052 | Peridomiciliar | 164 | 172 | 118 | 118 |
| 95 | Loja | GL5053 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 96 | Loja | GL5054 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 97 | Loja | AB5059 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 98 | Loja | AB5060 | Peridomiciliar | 162 | 162 | 118 | 118 |
| 99 | Loja | CG5061 | Peridomiciliar | 166 | 166 | 118 | 118 |
| 100 | Loja | CG5062 | Peridomiciliar | 0 | 0 | 118 | 118 |
| 101 | Loja | CG5063 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 116 | 118 |
| 102 | Loja | CG5064 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 103 | Loja | CG5065 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 104 | Loja | CG5066 | Peridomiciliar | 166 | 166 | 116 | 118 |
| 105 | Loja | CG5067 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 106 | Loja | CG5068 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 118 | 118 |
| 107 | Loja | CG5069 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 118 | 118 |
| 108 | Loja | CG5070 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 109 | Loja | AH5071 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 110 | Loja | AH5072 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 111 | Loja | AH5073 | Peridomiciliar | 162 | 172 | 118 | 118 |
| 112 | Loja | AH5074 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 118 | 118 |
| 113 | Loja | AH5075 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 114 | Loja | AH5076 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 115 | Loja | AH5077 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 116 | Loja | AH5078 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 118 | 118 |
| 117 | Loja | AH5079 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 118 | 118 |
| 118 | Loja | AH5080 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 118 | 118 |
| 119 | Loja | AH5081 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 120 | Loja | AH5082 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 121 | Loja | AH5083 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 118 | 118 |
| 122 | Loja | AH5084 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 118 | 118 |
| 123 | Loja | AH5085 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 118 | 118 |
| 124 | Loja | GL5086 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |

| | | | | | | | |
|-----|------|--------|----------------|-----|-----|-----|-----|
| 125 | Loja | GL5087 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 126 | Loja | GL5088 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 127 | Loja | GL5089 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 128 | Loja | GL5090 | Peridomiciliar | 162 | 162 | 118 | 118 |
| 129 | Loja | GL5091 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 130 | Loja | GL5092 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 131 | Loja | GL5093 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 118 | 118 |
| 132 | Loja | HY5102 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 116 | 118 |
| 133 | Loja | HY5103 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 134 | Loja | HY5104 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 116 | 118 |
| 135 | Loja | HY5105 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 116 | 118 |
| 136 | Loja | HY5106 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 137 | Loja | HY5107 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 138 | Loja | HY5108 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 116 | 118 |
| 139 | Loja | HY5109 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 140 | Loja | HY5110 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 141 | Loja | HY5111 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 142 | Loja | HY5112 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 143 | Loja | HY5113 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 116 | 118 |
| 144 | Loja | HY5114 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 145 | Loja | ND5115 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 146 | Loja | ND5116 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 147 | Loja | ND5117 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 148 | Loja | ND5118 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 149 | Loja | TR5119 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 150 | Loja | TR5120 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 151 | Loja | TR5121 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 118 | 118 |
| 152 | Loja | TR5122 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 116 | 118 |
| 153 | Loja | TR5123 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 116 | 118 |
| 154 | Loja | SS5124 | Peridomiciliar | 160 | 160 | 118 | 118 |
| 155 | Loja | ST5125 | Peridomiciliar | 0 | 0 | 116 | 118 |
| 156 | Loja | ST5126 | Peridomiciliar | 166 | 168 | 118 | 118 |

| | | | | | | | |
|-----|--------|--------|----------------|-----|-----|-----|-----|
| 157 | Loja | ST5127 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 118 | 118 |
| 158 | Loja | ST5128 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 116 | 118 |
| 159 | Loja | SS5129 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 160 | Loja | BR5130 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 161 | Loja | BR5131 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 162 | Loja | BR5132 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 163 | Loja | BR5133 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 118 | 118 |
| 164 | Loja | BR5134 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 165 | Loja | SS5135 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 166 | Loja | SS5136 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 167 | Loja | SS5137 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 168 | Loja | SS5138 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 169 | Manabi | MB5003 | Peridomiciliar | 166 | 166 | 116 | 116 |
| 170 | Manabi | MB5011 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 114 | 118 |
| 171 | Manabi | BJ5013 | Peridomiciliar | 166 | 166 | 114 | 118 |
| 172 | Manabi | BJ5014 | Peridomiciliar | 0 | 0 | 112 | 120 |
| 173 | Manabi | BJ5015 | Peridomiciliar | 168 | 168 | 112 | 114 |
| 174 | Manabi | BJ5016 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 110 | 112 |
| 175 | Manabi | ZP5017 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 114 | 114 |
| 176 | Manabi | ZP5018 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 112 | 112 |
| 177 | Manabi | ZP5019 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 114 | 114 |
| 178 | Manabi | ZP5020 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 179 | Manabi | ZP5021 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 114 | 114 |
| 180 | Manabi | ZP5022 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 181 | Manabi | ZP5023 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 114 | 118 |
| 182 | Manabi | MB5027 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 183 | Manabi | CA5032 | Peridomiciliar | 168 | 168 | 110 | 110 |
| 184 | Manabi | LE5033 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 114 | 118 |
| 185 | Manabi | JM5034 | Peridomiciliar | 162 | 166 | 114 | 118 |
| 186 | Manabi | JM5035 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 116 | 118 |
| 187 | Manabi | JM5036 | Peridomiciliar | 162 | 166 | 110 | 114 |
| 188 | Manabi | JM5037 | Peridomiciliar | 160 | 160 | 112 | 114 |

| | | | | | | | |
|-----|--------|---------|----------------|-----|-----|-----|-----|
| 189 | Manabi | JM5038 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 110 | 114 |
| 190 | Manabi | JM5039 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 114 | 118 |
| 191 | Manabi | JM5040 | Peridomiciliar | 168 | 168 | 112 | 118 |
| 192 | Manabi | JM5041 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 193 | Manabi | JM5042 | Peridomiciliar | 162 | 166 | 110 | 112 |
| 194 | Manabi | JM5043 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 112 | 118 |
| 195 | Manabi | JM5044 | Peridomiciliar | 168 | 170 | 110 | 120 |
| 196 | Manabi | JM5045 | Peridomiciliar | 162 | 162 | 120 | 120 |
| 197 | Manabi | BJ5145 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 118 | 118 |
| 198 | Manabi | BJ5146 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 199 | Manabi | BJ5147 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 114 | 118 |
| 200 | Manabi | BJ5148 | Peridomiciliar | 166 | 166 | 116 | 118 |
| 201 | Manabi | BJ5149 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 114 | 118 |
| 202 | Manabi | BJ2491 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 120 | 120 |
| 203 | Manabi | BJ2953 | Peridomiciliar | 166 | 166 | 116 | 118 |
| 204 | Manabi | ZAP3023 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 205 | Manabi | ZAP3024 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 112 | 116 |
| 206 | Manabi | ZAP3025 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 112 | 114 |
| 207 | Manabi | ZAP3026 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 208 | Manabi | NA3030 | Peridomiciliar | 160 | 168 | 116 | 118 |
| 209 | Manabi | NA3031 | Peridomiciliar | 168 | 168 | 112 | 118 |
| 210 | Manabi | NA3032 | Peridomiciliar | 160 | 160 | 114 | 118 |
| 211 | Manabi | NA3033 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 112 | 120 |
| 212 | Manabi | NA3034 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 112 | 118 |
| 213 | Manabi | CA3064 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 214 | Manabi | CA3068 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 110 | 118 |
| 215 | Manabi | BJ3089 | Peridomiciliar | 162 | 166 | 116 | 118 |
| 216 | Manabi | BJ3090 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 112 | 114 |
| 217 | Manabi | ZP3022 | Peridomiciliar | 160 | 160 | 112 | 116 |
| 218 | Manabi | ZP3023 | Peridomiciliar | 160 | 164 | 112 | 118 |
| 219 | Manabi | ZP3027 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 112 | 114 |
| 220 | Manabi | ZP3028 | Peridomiciliar | 166 | 166 | 112 | 114 |

| | | | | | | | |
|-----|--------|---------|----------------|-----|-----|-----|-----|
| 221 | Manabi | ZP3029 | Peridomiciliar | 160 | 160 | 118 | 118 |
| 222 | Manabi | QM3524 | Peridomiciliar | 168 | 168 | 114 | 118 |
| 223 | Manabi | CA3063 | Peridomiciliar | 162 | 164 | 110 | 112 |
| 224 | Manabi | CA3065 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 118 | 118 |
| 225 | Manabi | CA3067 | Peridomiciliar | 162 | 162 | 110 | 110 |
| 226 | Manabi | MB2477 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 110 | 118 |
| 227 | Manabi | MB2478 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 114 | 118 |
| 228 | Manabi | MB2479 | Peridomiciliar | 160 | 166 | 118 | 118 |
| 229 | Manabi | MB2480 | Peridomiciliar | 164 | 166 | 118 | 118 |
| 230 | Manabi | MB2481 | Peridomiciliar | 166 | 166 | 110 | 118 |
| 231 | Manabi | MB2482 | Peridomiciliar | 166 | 166 | 0 | 0 |
| 232 | Manabi | MB2487 | Peridomiciliar | 160 | 162 | 112 | 114 |
| 233 | Manabi | MB2488 | Peridomiciliar | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 234 | Manabi | MB4106 | Peridomiciliar | 174 | 174 | 114 | 118 |
| 235 | Loja | ND2712 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 236 | Loja | ND2713 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 237 | Loja | ND2823 | Silvestre | 160 | 164 | 118 | 118 |
| 238 | Loja | ND2824 | Silvestre | 164 | 164 | 0 | 0 |
| 239 | Loja | ND3358 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 240 | Loja | SSN3510 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 116 |
| 241 | Loja | SSN3511 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 242 | Loja | SSN3512 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 116 |
| 243 | Loja | SSN3513 | Silvestre | 172 | 172 | 118 | 118 |
| 244 | Loja | SSN3514 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 245 | Loja | SSN3515 | Silvestre | 0 | 0 | 118 | 118 |
| 246 | Loja | SSN3516 | Silvestre | 164 | 164 | 0 | 0 |
| 247 | Loja | CG2405 | Silvestre | 0 | 0 | 114 | 118 |
| 248 | Loja | CG2433 | Silvestre | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 249 | Loja | CG2640 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 250 | Loja | CG2641 | Silvestre | 164 | 164 | 0 | 0 |
| 251 | Loja | CG2642 | Silvestre | 160 | 160 | 118 | 118 |
| 252 | Loja | CG2838 | Silvestre | 164 | 164 | 0 | 0 |

| | | | | | | | |
|-----|------|--------|-----------|-----|-----|-----|-----|
| 253 | Loja | CG2839 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 254 | Loja | CG2840 | Silvestre | 162 | 164 | 114 | 114 |
| 255 | Loja | CG2841 | Silvestre | 162 | 162 | 118 | 118 |
| 256 | Loja | CG2842 | Silvestre | 162 | 162 | 118 | 118 |
| 257 | Loja | CG2843 | Silvestre | 162 | 162 | 0 | 0 |
| 258 | Loja | CG2844 | Silvestre | 162 | 162 | 118 | 118 |
| 259 | Loja | CG3479 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 116 |
| 260 | Loja | CG3480 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 261 | Loja | CG3481 | Silvestre | 160 | 160 | 118 | 118 |
| 262 | Loja | GL3422 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 263 | Loja | GL3424 | Silvestre | 164 | 166 | 118 | 118 |
| 264 | Loja | TR5001 | Silvestre | 160 | 160 | 116 | 118 |
| 265 | Loja | TR5002 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 266 | Loja | CG5055 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 267 | Loja | CG5056 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 268 | Loja | CG5057 | Silvestre | 160 | 164 | 116 | 118 |
| 269 | Loja | CG5058 | Silvestre | 0 | 0 | 116 | 118 |
| 270 | Loja | CG5151 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 271 | Loja | CG5152 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 272 | Loja | CG5153 | Silvestre | 164 | 164 | 114 | 116 |
| 273 | Loja | CG5154 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 274 | Loja | CG5155 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 275 | Loja | CG5156 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 276 | Loja | CG5157 | Silvestre | 164 | 164 | 112 | 114 |
| 277 | Loja | CG5158 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 278 | Loja | CG5159 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 279 | Loja | CG5160 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 280 | Loja | CG5161 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 281 | Loja | CG5162 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 282 | Loja | CG5163 | Silvestre | 160 | 160 | 118 | 118 |
| 283 | Loja | CG5164 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 118 |
| 284 | Loja | CG5165 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 118 |

| | | | | | | | |
|-----|--------|---------|-----------|-----|-----|-----|-----|
| 285 | Loja | CG5166 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 286 | Loja | CG5167 | Silvestre | 0 | 0 | 118 | 118 |
| 287 | Manabi | MB5012 | Silvestre | 164 | 166 | 112 | 120 |
| 288 | Manabi | MB5024 | Silvestre | 166 | 166 | 116 | 120 |
| 289 | Manabi | MB5025 | Silvestre | 166 | 166 | 114 | 118 |
| 290 | Manabi | MB5026 | Silvestre | 164 | 170 | 112 | 114 |
| 291 | Manabi | MB5028 | Silvestre | 164 | 166 | 114 | 118 |
| 292 | Manabi | MB5029 | Silvestre | 166 | 166 | 114 | 118 |
| 293 | Manabi | MB5030 | Silvestre | 166 | 166 | 116 | 120 |
| 294 | Manabi | BJ5031 | Silvestre | 164 | 164 | 114 | 118 |
| 295 | Manabi | BJ5046 | Silvestre | 162 | 162 | 114 | 114 |
| 296 | Manabi | MB5141 | Silvestre | 164 | 166 | 114 | 118 |
| 297 | Manabi | MB5142 | Silvestre | 164 | 166 | 118 | 120 |
| 298 | Manabi | MB5143 | Silvestre | 164 | 166 | 118 | 120 |
| 299 | Manabi | MB5144 | Silvestre | 166 | 166 | 116 | 118 |
| 300 | Manabi | BJ5150 | Silvestre | 162 | 166 | 116 | 118 |
| 301 | Manabi | BJ3092 | Silvestre | 166 | 166 | 112 | 114 |
| 302 | Manabi | BJ3093 | Silvestre | 162 | 170 | 114 | 118 |
| 303 | Manabi | BJ3094 | Silvestre | 168 | 168 | 116 | 118 |
| 304 | Manabi | BJ3095 | Silvestre | 168 | 168 | 110 | 118 |
| 305 | Manabi | BJ3096 | Silvestre | 166 | 166 | 112 | 114 |
| 306 | Manabi | BJ3097 | Silvestre | 164 | 164 | 114 | 118 |
| 307 | Manabi | MB3445 | Silvestre | 160 | 166 | 118 | 118 |
| 308 | Manabi | MBN3446 | Silvestre | 164 | 164 | 116 | 118 |
| 309 | Manabi | MB3447 | Silvestre | 164 | 166 | 116 | 118 |
| 310 | Manabi | MBN3483 | Silvestre | 162 | 166 | 114 | 120 |
| 311 | Manabi | MBN3487 | Silvestre | 164 | 166 | 112 | 114 |
| 312 | Manabi | MBN3488 | Silvestre | 164 | 164 | 118 | 120 |
| 313 | Manabi | MBN3489 | Silvestre | 160 | 164 | 118 | 118 |
| 314 | Manabi | MBN3490 | Silvestre | 164 | 164 | 114 | 114 |
| 315 | Manabi | MBN3491 | Silvestre | 162 | 164 | 112 | 120 |
| 316 | Manabi | MBN3492 | Silvestre | 160 | 160 | 112 | 114 |

| | | | | | | | |
|-----|--------|---------|-----------|-----|-----|-----|-----|
| 317 | Manabi | MBN3493 | Silvestre | 162 | 166 | 118 | 118 |
| 318 | Manabi | MBN3494 | Silvestre | 162 | 166 | 118 | 118 |
| 319 | Manabi | MBN3506 | Silvestre | 162 | 164 | 114 | 114 |
| 320 | Manabi | MBN3507 | Silvestre | 162 | 162 | 114 | 114 |
| 321 | Manabi | BJ5952 | Silvestre | 164 | 164 | 114 | 118 |
| 322 | Manabi | BJ5953 | Silvestre | 164 | 166 | 112 | 114 |
| 323 | Manabi | BJN3110 | Silvestre | 160 | 160 | 110 | 114 |
| 324 | Manabi | BJ3761 | Silvestre | 166 | 166 | 118 | 118 |
| 325 | Manabi | BJ3762 | Silvestre | 166 | 166 | 118 | 118 |
| 326 | Manabi | BJ3763 | Silvestre | 164 | 166 | 114 | 118 |
| 327 | Manabi | BJ3764 | Silvestre | 170 | 170 | 110 | 118 |
| 328 | Manabi | BJ3765 | Silvestre | 160 | 168 | 114 | 118 |
| 329 | Manabi | BJ3766 | Silvestre | 168 | 174 | 114 | 118 |
| 330 | Manabi | BJ3767 | Silvestre | 164 | 168 | 114 | 114 |
| 331 | Manabi | BJ3768 | Silvestre | 162 | 162 | 118 | 118 |
| 332 | Manabi | BJ3769 | Silvestre | 174 | 174 | 0 | 0 |
| 333 | Manabi | BJ3770 | Silvestre | 162 | 164 | 114 | 118 |

Anexo 24. Publicaciones realizadas desde inicios del Doctorado (2006-2011).

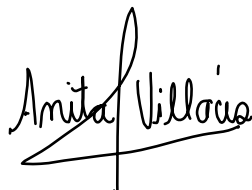
1. **Villacís AG.**, Grijalva MJ., Arcos-Terán L. 2008. Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & León, 1958 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions”. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro 103: 690-695.
2. Grijalva MJ and **Villacís AG.** 2009. Presence of *Rhodnius ecuadoriensis* in Sylvatic Habitats in the Southern Highlands (Loja Province) of Ecuador. *Journal Medical Entomology* 46: 708-711.
3. Suarez-Davalos MV., Dangles O., **Villacís AG.**, Grijalva Mario J. 2010. Microdistribution of sylvatic triatomine populations in Central-coastal Ecuador. *Journal Medical Entomology* 47: 80-88.
4. Grijalva MJ., Palomeque FS., **Villacís AG.**, Black CL., Arcos-Terán L. 2010. Absence of domestic triatomine colonies in an area where Chagas Disease is considered endemic in the coastal region of Ecuador. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro 105: 677-681.
5. **Villacís AG.**, Grijalva MJ., Catalá SS. 2010. Phenotypic variability of *Rhodnius ecuadoriensis* populations at the Ecuadorian central and southern Andean region. *Journal of Medical Entomology* 47:1034-1043.
6. Grijalva MJ., **Villacís AG.**, Ocaña-Mayorga S., Yumiseva CA., Baus EG. 2011. Limitations of selective deltamethrin application for triatomine control in central coastal Ecuador. *Parasites and Vectors* 4:20 (18 February 2011).

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Anita Gabriela Villacís Salazar, C.C. 170650453-5, autor del trabajo de graduación titulado: “**Análisis de Variabilidad Fenotípica y Diversidad Genética de poblaciones sinantrópicas y silvestres de *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent y León) en dos provincias endémicas para la Enfermedad de Chagas en Ecuador**” previa a la obtención del grado académico de DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 27 de septiembre 2011

A handwritten signature in black ink, reading "Anita Villacís". The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke at the bottom.

Anita Gabriela Villacís Salazar

C.C. 170650453-5